

Aus der Klinik für Innere Medizin V
Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Dr. R. Bals

FOXO-Transkriptionsfaktoren regulieren die angeborene Immunität in Atemwegsepithelzellen

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät*

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von:

Frederik Seiler

geboren am 28.08.1986 in Ottweiler

Zusammenfassung

FOXO-Transkriptionsfaktoren regulieren die angeborene Immunität in Atemwegsepithelzellen

Bakterielle Pathogene sind eine wichtige Ursache von Atemwegsinfektionen und tragen zu akuten Exazerbationen und langfristiger Verschlechterung chronischer Atemwegserkrankungen bei. Das angeborene Immunsystem der Atemwege kontrolliert und verhindert die Kolonisation der Lunge mit bakteriellen Pathogenen. Neuere Studien bringen das angeborene Immunsystem mit Forkhead-Box-Transkriptionsfaktoren der Klasse O (FOXO) in Verbindung. FOXO-Transkriptionsfaktoren sind zentrale Regulatoren des zellulären Metabolismus, der Proliferation und der Stressresistenz. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von FOXO innerhalb der angeborenen Immunität von Atemwegsepithelzellen zu untersuchen. Es wurde gezeigt, dass bakterielle Pathogene *in vitro* zur Aktivierung von FOXO in Atemwegsepithelzellen führen. Infektion von Mäusen mit bakteriellen Pathogenen resultierte ebenfalls in der Aktivierung von FOXO in alveolaren und bronchialen Epithelzellen. Aktives FOXO war auch nachweisbar in humanem Bronchialgewebe von Patienten mit verschiedenen infektionsassoziierten Lungenerkrankungen. Silencing von FOXO in Atemwegsepithelzellen mit siRNA resultierte in einer reduzierten Expression von Faktoren der angeborenen Immunität, darunter antimikrobielle Peptide und proinflammatorische Zytokine. Die verminderte Expression dieser Gene zeigte sich sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Infektion. Des Weiteren beeinflusste das Silencing von FOXO die Internalisierung von *Haemophilus influenzae* in Atemwegsepithelzellen. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die TLR3-vermittelte angeborene Immunantwort FOXO-abhängig erfolgt. Zusammengefasst sind FOXO-Transkriptionsfaktoren an der Vermittlung der zellulären Antwort auf bakterielle Stimuli beteiligt und fungieren als nicht redundante Schlüsselregulatoren der angeborenen Immunität von Atemwegsepithelzellen.

Abstract

FOXO transcription factors regulate innate immunity in respiratory epithelial cells

Bacterial pathogens are a leading cause of lung infections and contribute to acute exacerbations and long term aggravation of chronic respiratory tract diseases. The innate immune system of the respiratory tract controls and prevents colonization of the lung with bacterial pathogens. Recent studies linked innate immunity to Forkhead box transcription factor class O (FOXO). FOXO transcription factors are key regulators of cellular metabolism, proliferation and stress resistance. This study aimed to investigate the role of FOXO transcription factors in innate immune functions of respiratory epithelial cells. It is shown that bacterial pathogens potently activate FOXO transcription factors in cultured human respiratory epithelial cells *in vitro*. Infection of mice with bacterial pathogens resulted in the activation of FOXO transcription factors in alveolar and bronchial epithelial cells. Active FOXO was also detectable in human bronchial tissue obtained from subjects with different infection-related lung diseases. siRNA-mediated silencing of FOXO in bronchial epithelial cells resulted in reduced expression of genes of the innate immune system such as antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines, both under basal conditions and upon infection. FOXO deficiency further affected internalization of *Haemophilus influenzae* in bronchial epithelial cells. Finally, it is shown that TLR3 activates innate immune responses in a FOXO-dependent manner. In conclusion, FOXO transcription factors are involved in the cellular responses to bacterial stimuli and act as non-redundant key regulators of respiratory epithelial cell innate immunity.

Inhalt

Zusammenfassung.....	i
Abstract.....	iii
Inhalt	iv
1 Einleitung.....	1
1.1 Die angeborene Immunität des Respirationstraktes	1
1.1.1 Die Bedeutung chronischer bakterieller Infektionen der Atemwege	1
1.1.2 Die angeborene Immunität des Atemwegsepithels	2
1.1.3 Pathogenerkennung durch epitheliale Toll-like-Rezeptoren.....	3
1.1.4 Toll-like-Rezeptor 4	7
1.1.5 Toll-like-Rezeptor 3	8
1.2 Der PI3K-AKT-Signalweg	8
1.3 FOXO-Transkriptionsfaktoren	9
1.3.1 Die Familie der Forkhead-Box-Transkriptionsfaktoren	9
1.3.2 Die Forkhead-Box-Domäne.....	10
1.3.3 Die Forkhead-Box-Klasse O.....	11
1.3.4 Regulation von FOXO-Transkriptionsfaktoren	12
1.3.5 FOXO-Transkriptionsfaktoren und angeborene Immunität.....	16
1.4 Fragestellung	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Geräte	20
2.2 Software.....	20
2.3 Tierversuche	21
2.4 Zellkultur.....	21
2.4.1 Kultivierung von Calu-3-Zellen.....	21
2.4.2 Kultivierung primärer humaner Bronchialepithelzellen (HBEC).....	22
2.5 Bakterien	22

2.5.1	Nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i> (NTHi)	22
2.5.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	23
2.6	siRNA-Transfektion	23
2.7	Stimulationsexperimente	24
2.7.1	Stimulation mit Bakterien	24
2.7.2	Stimulation mit TLR-Agonisten und Zytokinen.....	25
2.8	RNA-Isolation	25
2.9	cDNA-Synthese.....	26
2.10	Quantitative Real-time-PCR.....	26
2.11	Transkriptionsfaktorbindeassay.....	27
2.12	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	27
2.13	NTHi-Internalisierungsassay.....	28
2.14	LDH-Zytotoxizitätsassay.....	29
2.15	Immunfluoreszenzmikroskopie	30
2.16	Gewinnung von humanem Bronchialgewebe.....	30
2.17	Immunhistochemie	31
2.18	Statistische Analyse.....	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Bakterielle Infektion führt zur Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren in Atemwegsepithelzellen <i>in vivo</i>	34
3.2	Bakterielle Infektion führt zur Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren in Atemwegsepithelzellen <i>in vitro</i>	36
3.3	Bakterielle Infektion hat keinen Einfluss auf die pulmonale FOXO3-Expression	37
3.4	Nach Infektion nukleär translozierte FOXO-Transkriptionsfaktoren sind transkriptionell aktiv	37
3.5	Suppression der Expression von FOXO1 und FOXO3 in Calu-3-Zellen durch siRNA	38

3.6	FOXO-Transkriptionsfaktoren regulieren Expression und Freisetzung von Faktoren der angeborenen Immunität in Atemwegsepithelzellen.....	40
3.7	FOXO-Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Internalisierung von NTHi in Atemwegsepithelzellen	44
3.8	Validierung des NTHi-Internalisierungsassays	45
3.9	FOXO1/3-silencing hat keinen Einfluss auf die TLR5-vermittelte angeborene Immunantwort von Atemwegsepithelzellen	47
3.10	FOXO1/3-silencing hat keinen Einfluss auf die IL-1 β -vermittelte angeborene Immunantwort von Atemwegsepithelzellen	48
3.11	FOXO-Transkriptionsfaktoren sind essenziell für die TLR3-vermittelte angeborene Immunantwort von Atemwegsepithelzellen	49
3.12	FOXO1/3-silencing hat keinen Einfluss auf die Expression von TLR3 in Atemwegsepithelzellen	51
3.13	Stimulation von Atemwegsepithelzellen mit Poly-(I:C) in einer Konzentration von 1 μ g/ml führt nicht zum Zelltod.....	52
3.14	Suppression der Expression von FOXO1 und FOXO3 in primären humanen Bronchialepithelzellen durch siRNA	53
3.15	Einfluss von Insulin auf die FOXO-vermittelte angeborene Immunantwort in primären humanen Bronchialepithelzellen	54
3.16	Einfluss von Insulin auf die Internalisierung von NTHi in primären bronchialen Atemwegsepithelzellen	57
3.17	Die TLR3-induzierte FOXO-Aktivierung übertrifft die insulininduzierte FOXO-Inaktivierung.....	58
3.18	FOXO-Transkriptionsfaktoren sind aktiv in Patienten mit akuter und chronischer Infektion der Atemwege	59
4	Diskussion.....	62
4.1	FOXO-Transkriptionsfaktoren als transkriptionelle Regulatoren der angeborenen Immunität	62
4.2	FOXO-Transkriptionsfaktoren und spezifisches Antwortverhalten von Atemwegsepithelzellen	64

4.3	FOXO-Transkriptionsfaktoren als Mediatoren endosomaler TLR-Signaltransduktion	65
4.4	FOXO-Transkriptionsfaktoren und Internalisierung von Pathogenen in Atemwegsepithelzellen	67
4.5	FOXO-Transkriptionsfaktoren als Integratoren metabolischer und immunologischer Stressoren	68
4.6	Die Rolle von FOXO bei akuter und chronischer Infektion der Lunge	71
4.7	Ausblick.....	73
5	Literaturverzeichnis	74
6	Anhang.....	99
6.1	Publikationen.....	99
6.1.1	Peer Review Publikationen	99
6.1.2	Tagungsbeiträge	100
6.2	Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4	101
6.3	Lebenslauf	102

1 Einleitung

1.1 Die angeborene Immunität des Respirationstraktes

Die epitheliale Oberfläche der Atemwege und Lungen stellt die größte Kontaktfläche des Körpers mit der äußeren Umgebung dar und unterliegt einer kontinuierlichen Exposition gegenüber respiratorischen Pathogenen. Zur Verhinderung von Infektionen der Lunge und Kolonialisierung der Atemwege mit Mikroorganismen verfügt das Atemwegsepithel über effektive Immunmechanismen. Eine wichtige Komponente innerhalb dieses komplexen Systems sind neben professionellen Immunzellen (z.B. Makrophagen und Granulozyten) die Epithelzellen der Atemwege.

1.1.1 Die Bedeutung chronischer bakterieller Infektionen der Atemwege

Die Frage, ob die unteren Atemwege steril sind, oder ein Mikrobiom der Lunge existiert, ist nach heutigem Wissenstand nicht abschließend zu beantworten [41]. Fest steht jedoch, dass klassische pathogene Bakterien wie *H. influenzae* und *P. aeruginosa* bei gesunden Individuen auch mit hochsensitiven Methoden zumeist nicht nachweisbar sind [74]. Eine wichtige Rolle spielt die chronische Infektion der unteren Atemwege jedoch bei Erkrankungen wie der Chronisch-obstruktiven Lungenkrankheit (COPD) oder der Cystischen Fibrose (CF).

Bei der COPD induzieren exogene Stimuli (beispielsweise Zigarettenrauch) einen Defekt der angeborenen Immunität der Lunge [164]. Dadurch kommt es einerseits zu rezidivierenden akuten Infektionen, die klinisch als akute Exazerbationen manifest werden, andererseits zur Etablierung chronischer Infektionen der Atemwege mit Pathogenen. Der bei COPD am häufigsten anzutreffende kolonialisierende Keim ist NTHi [128,206]. NTHi ist dabei in der Lage, in den Atemwegen von COPD-Patienten dauerhaft zu persistieren und lässt sich mit antibiotischer Therapie meist nicht eradizieren [159]. Häufig lässt sich NTHi im Atemwegsepithel von COPD-Patienten auch intrazellulär nachweisen [13].

Auch bei der CF gehen neuere Untersuchungen davon aus, dass die chronische Infektion der Atemwege die zentrale Komponente des pathophysiologischen Geschehens darstellt

[33]. Dabei werden in einer altersabhängigen Sequenz verschiedene Bakterienspezies und -stämmen durchlaufen, bis sich meist ein dominanter Stamm etabliert, der nicht mehr geklärt werden kann [27]. In Kindesalter am häufigsten nachweisbar sind *Staphylococcus aureus* und NTHi [156]. Diese führen zu einer frühen Schädigung des Atemwegsepithels. Hierdurch wird die Suszeptibilität für Infektionen mit *P. aeruginosa* erhöht [119], dem Keim der bei ca. 80% der über 18-jährigen Patienten nachweisbar ist [179]. Die kolonialisierenden *P. aeruginosa*-Stämme weisen eine Vielzahl von Mutationen auf [123]. Sie sind gekennzeichnet durch eine ausgesprochen hohe Resistenz und persistieren häufig jahrzehntelang [35].

Die chronische Infektion der Atemwege mit pathogenen Bakterien stellt sowohl bei der COPD, als auch der CF nicht nur ein Epiphänomen dar, sondern ist maßgeblich für die jeweils typische Destruktion der Atemwege verantwortlich [27,163]. Daher ist die Erforschung der Interaktion zwischen Wirtsorganismus und Pathogen innerhalb der Atemwege wesentlich für das Verständnis dieser bedeutenden Erkrankungen.

1.1.2 Die angeborene Immunität des Atemwegsepithels

Das Atemwegsepithel der großen luftleitenden Atemwege ist ein pseudostratifiziertes Epithel. Es ist im Wesentlichen aufgebaut aus gering differenzierten Basalzellen, zilientragenden Zellen, mukusproduzierenden Becherzellen, und den sekretorischen Clarazellen [153,155].

Klassischerweise wurden als Immunfunktionen des Atemwegsepithels vor allem einfache Mechanismen wie die Bildung einer mechanischen Barriere mit Hilfe von Tight junctions und die mukoziliäre Clearance betrachtet. In der vergangenen Dekade wurde das Atemwegsepithel jedoch zunehmend als immunologisch aktive Struktur identifiziert, die auch komplexe Funktionen innerhalb der angeborenen Immunität des Respirationstraktes wahrnimmt [12,15,41,73,144,185]: Atemwegsepithelzellen produzieren ein breites Spektrum antimikrobieller Substanzen, darunter Defensine und Cathelicidin, und tragen so zur Verhinderung bakterieller Infektionen bei. Darüber hinaus sind Atemwegsepithelzellen dazu in der Lage, Pathogene spezifisch zu erkennen und daraufhin in einen immunologisch aktiven Zustand überzugehen. Dabei werden die Produktion antimikrobieller Substanzen gesteigert und durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine professionelle Immunzellen aktiviert. Die durch die

aktivierten Immunzellen freigesetzten Substanzen, wie IL-17 und IL-1 β , tragen zusätzlich zur Steigerung der immunologischen Aktivität des Atemwegsepithels bei. Damit stellt das Atemwegsepithel eine zentrale Komponente der angeborenen Immunität dar und spielt auch für die Initialisierung und Amplifizierung komplexer Immunmechanismen eine wichtige Rolle.

Die spezifische Pathogenerkennung durch Atemwegsepithelzellen erfolgt über die Detektion konservierter mikrobieller Strukturen, so genannter PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Hierbei handelt es sich um Bestandteile von Mikroorganismen, deren Expression aufgrund ihrer lebenswichtigen Funktion essenziell und kaum durch Mutation zu verändern ist [3]. Da PAMPs spezifische Produkte mikrobieller Stoffwechselwege sind, erlauben sie dem Immunsystem des Wirts zudem die Differenzierung körpereigener und körperfremder Strukturen [125]. Zu den PAMPs zählen beispielsweise Bestandteile der bakteriellen Zellwand oder bakterielle und virale Nukleinsäuren. PAMPs werden erkannt durch Mustererkennungsrezeptoren („pattern-recognition receptors“, PRRs), zu denen unter anderem die membranständigen Toll-like-Rezeptoren (TLRs), sowie die zytosolischen NOD-like- und RIG-I-like-Rezeptoren gehören [106].

1.1.3 Pathogenerkennung durch epitheliale Toll-like-Rezeptoren

Die Familie der Toll-like-Rezeptoren besteht aus zehn humanen, bzw. zwölf murinen Genen [95]. Das Atemwegsepithel exprimiert das komplette Spektrum an TLRs [144,165]. Eine Auflistung der humanen TLRs und der detektierten PAMPs findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1. Liste der humanen Toll-like-Rezeptoren und ihrer Liganden

TLR	Typischer Ligand (Beispiel)	Referenz
TLR1	Lipopeptide	[173]
TLR2	Lipoteichonsäure	[162]
TLR3	dsRNA	[4]
TLR4	Lipopolysaccharid	[151]
TLR5	Flagellin	[68]
TLR6	Lipoproteine	[136]
TLR7	ssRNA	[70]
TLR8	ssRNA	[70]
TLR9	CpG-DNA	[72]
TLR10	unbekannt	[57]

Strukturell handelt es sich bei den Toll-like-Rezeptoren um Transmembranproteine vom Typ I mit drei Domänen [95]: Die Ektodomäne ist durch Leucin-reiche Wiederholungseinheiten charakterisiert und vermittelt die spezifische PAMP-Erkennung. Eine integrale Transmembrandomäne dient der Verankerung des Proteins in der Membran. Die intrazelluläre Toll-Interleukin-1-Rezeptor-Domäne (TIR-Domäne) fungiert als Bindungsstelle für verschiedene TIR-Adapterproteine und vermittelt so die intrazelluläre Signaltransduktion. Die Gruppe der TIR-Adapterproteine umfasst MyD88, TRIF, TRAM und TIRAP, die ebenfalls alle über eine TIR-Domäne verfügen.

Lokalisiert sind TLRs je nach Subtyp in verschiedenen Kompartimenten, darunter Plasmamembran, Endosom, Lysosom und Endolysosom [3]. Für die Aktivierung in intrazellulären Kompartimenten lokalisierter TLRs ist demnach die Internalisierung von PAMPs erforderlich [3].

Die intrazelluläre Signaltransduktion der TLRs lässt sich in zwei getrennte Signalwege unterteilen, die nach den jeweils beteiligten Adapterproteinen bezeichnet werden. Hiernach unterscheidet man den MyD88-abhängigen Signalweg und den TRIF-abhängigen Signalweg (s. Abbildung 1).

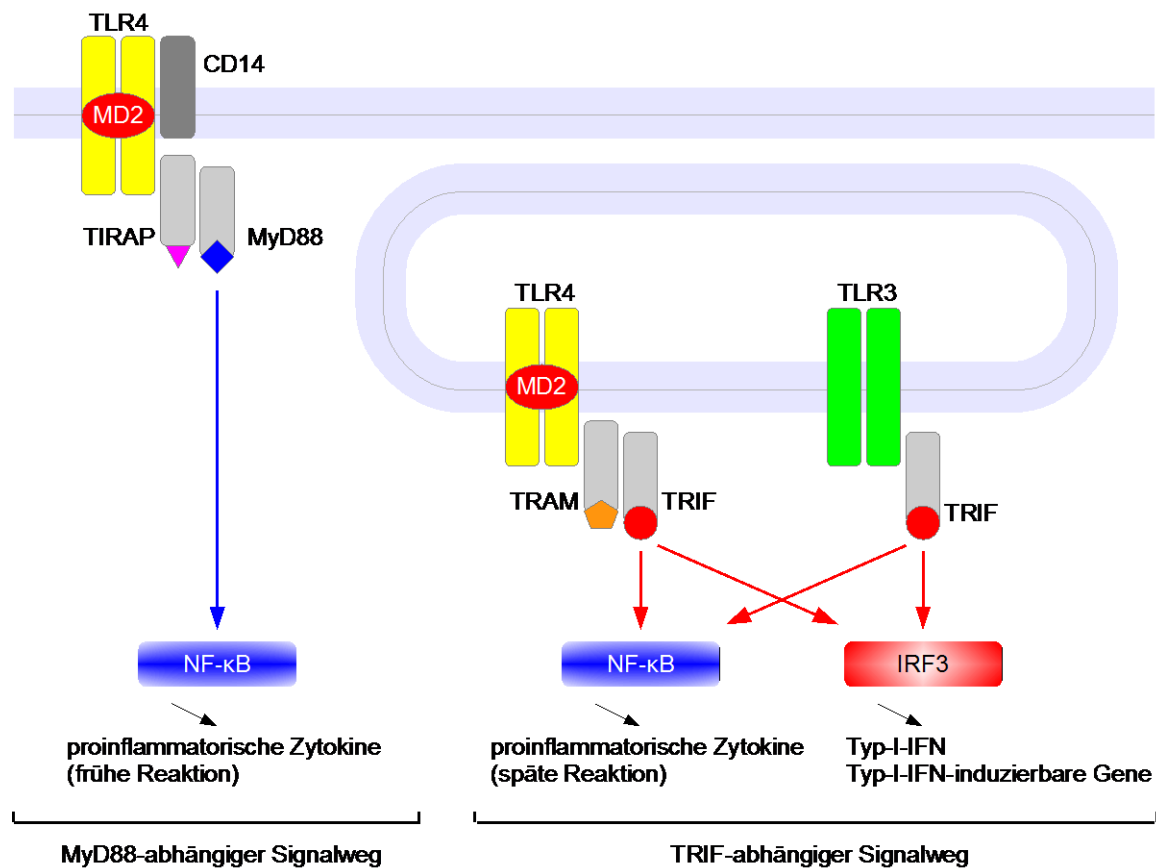


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Signaltransduktion von TLR4 und TLR3

Die CD14-abhängige Bindung von LPS an den TLR4/MD2-Komplex auf der Zelloberfläche führt zur Initialisierung des MyD88-abhängigen Signalweges. Hierbei kommt es zur Rekrutierung von TIRAP und MyD88, sowie in der Folge zur frühen NF-κB-Aktivierung. Diese resultiert in der Transkription proinflammatorischer Zytokine.

Im Gegensatz hierzu induziert die Aktivierung von endosomalem TLR4 und TLR3 den TRIF-abhängigen Signalweg, der einerseits über IRF3-Aktivierung zur Transkription von Typ-I-Interferon und Typ-I-Interferon-induzierbaren Genen führt, andererseits über eine späte NF-κB-Aktivierung zur Transkription proinflammatorischer Zytokine.

Der MyD88-abhängige Signalweg

Mit Ausnahme von TLR3 sind alle TLRs zur Aktivierung des MyD88-abhängigen Signalweges fähig, dessen Endstrecke die Aktivierung von NF-κB und die Produktion proinflammatorischer Zytokine ist [95].

Nach Bindung des TLR-Liganden und Rezeptoraktivierung kommt es zur Rekrutierung des TIR-Adapterproteins MyD88 [95]. MyD88 bindet entweder direkt an die TIR-Domäne des aktivierten Rezeptors oder, im Falle von TLR2 und TLR4, indirekt über das an den TLR gebundene Adapterprotein TIRAP [95]. Anschließend erfolgt die Rekrutierung und Aktivierung mehrerer Kinasen vom Typ IRAK („IL-1R-associated

kinase“), zunächst IRAK-4, dann sequenziell weitere (IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M) [93,95]. Diese aktivieren TRAF6 [29,95]. Über diverse Zwischenschritte kommt es zur Aktivierung des IKK-Komplexes mit anschließender Phosphorylierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B und damit Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dieser induziert die Transkription inflammatorischer Zytokine und weiterer Faktoren, darunter IL-6, IL-8, TNF und das Defensin hBD-2 [34,107,114,182].

Der TRIF-abhängige Signalweg

Der TRIF-abhängige Signalweg (auch MyD88-unabhängiger Signalweg genannt) wird nur durch endosomales TLR4 und TLR3 aktiviert und führt neben der Aktivierung von NF- κ B auch zur Induktion von Typ-I-Interferonen und Typ-I-Interferon-induzierbarer Gene [95].

Nach TLR-Aktivierung kommt es zur Rekrutierung des TIR-Adapterproteins TRIF, das im Falle von TLR3 direkt an die TIR-Domäne des TLR bindet [106]. Bei TLR4 erfolgt die Bindung auch hier indirekt, in diesem Fall über das zwischengeschaltete Adapterprotein TRAM [199]. Anschließend induziert TRIF die Rekrutierung und Aktivierung von TRAF6 und RIP-1, was unter Beteiligung diverser weiterer Faktoren schließlich die Aktivierung von NF- κ B einleitet [95].

Darüber hinaus führt der TRIF-abhängige Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3. Dieser induziert die Transkription von Typ-I-Interferonen, die wiederum die Transkription Typ-I-Interferon-induzierbarer Gene (wie das Chemokin IP-10) hervorrufen [3]. Zusätzlich induziert IRF3 die Transkription von IP-10 auch direkt [75,137].

Als in der vorliegenden Arbeit wichtige TLRs werden in den folgenden Abschnitten TLR4 und TLR3 näher beschrieben.

1.1.4 Toll-like-Rezeptor 4

TLR4 ist der zuerst identifizierte TLR und wurde als Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS), einen Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien wie Nontypeable *H. influenzae* (NTHi) und *P. aeruginosa*, beschrieben [95]. Neben LPS wurde eine Vielzahl weiterer TLR4-Liganden identifiziert, darunter mikrobielle PAMPs wie Pneumolysin aus *Streptococcus pneumoniae* und das RSV-Fusionsprotein, aber auch endogene Substanzen wie Surfactantprotein A und Fibrinogen [3,63].

TLR4 liegt in zwei Subpopulationen vor. Ein Teil ist auf der Zelloberfläche lokalisiert, ein anderer Teil befindet sich im endosomalen Kompartiment [95].

Als einziger TLR ist TLR4 in der Lage, sowohl den MyD88-abhängigen als auch den TRIF-abhängigen Signalweg zu aktivieren, woran alle vier bekannten TIR-Adapterproteine beteiligt sind [95]. Oberflächen-TLR4 bildet mit dem Protein MD2 einen Komplex, der als Bindekomponente für LPS agiert [2]. Darüber hinaus ist Oberflächen-TLR4 auf den Corezeptor CD14 angewiesen. CD14 bindet Komplexe aus LPS und LPS-binding peptide (LBP) und bringt diese mit TLR4/MD2 in Interaktion [3,95,108]. Die anschließende TLR4-vermittelte angeborene Immunreaktion läuft wie folgt ab: An der aktivierten intrazellulären TIR-Domäne kommt es zur Rekrutierung des TIR-Adapters TIRAP. Dieser wiederum rekrutiert MyD88, was zur Initialisierung des MyD88-abhängigen Signalweges führt. Dies resultiert in einer frühen NF- κ B- und MAPK-Aktivierung. Anschließend kommt es CD14-abhängig zur Rezeptorendozytose. Endosomales LPS bindet unmittelbar an endosomales TLR4. Dies induziert die Rekrutierung des TIR-Adapters TRAM, der seinerseits die Verbindung zu TRIF herstellt. Es folgt die Initialisierung des MyD88-unabhängigen Signalweges, der zu einer späten NF- κ B- und MAPK-Aktivierung, sowie zu einer Aktivierung von IRF3 führt [49,67,90,91,95,176,199,205].

In Atemwegsepithelzellen, die einer frequenten Stimulation durch LPS unterliegen, reichert sich TLR4 bevorzugt endosomal an [65]. Zudem ist die Funktion von Oberflächen-TLR4 in Atemwegsepithelzellen durch niedrige Expression der Corezeptoren MD2 [87] und CD14 [58] limitiert.

1.1.5 Toll-like-Rezeptor 3

TLR3 wurde erstmals beschrieben als Rezeptor für das synthetische dsRNA-Analogon Poly-(I:C) [95]. Weitere Aktivatoren von TLR3 sind dsRNA diverser viraler Spezies [3], aber auch endogene Liganden wie unabhängig von viraler Infektion freigesetzte RNA aus Wirtszellen [31,92]. Darüber hinaus wurde TLR3 auch eine Bedeutung bei bakteriellen Infektionen zugesprochen. So wurde gezeigt, dass Stimulation von Atemwegsepithelzellen mit NTHi zur direkten Aktivierung des TLR3-Signalweges führt [177]. Die Expression von TLR3 in Atemwegsepithelzellen nach Infektion mit NTHi ist erhöht [157]. Wie auch in den meisten anderen Zellen [3], wird TLR3 im Atemwegsepithel ausschließlich endosomal exprimiert [64]. Besonderes Merkmal von TLR3 ist zudem, dass er nach Aktivierung als einziger TLR exklusiv den TRIF-abhängigen Signalweg initialisiert [94].

1.2 Der PI3K-AKT-Signalweg

Der PI3K-AKT-Signalweg ist ein Mechanismus der Signaltransduktion, der eine Vielzahl zellulärer Funktionen reguliert [28]. Zu den wichtigsten Aktivatoren des PI3K-AKT-Signalwegs zählen Insulin und Wachstumsfaktoren wie Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) [28]. Insulin bindet an den Insulinrezeptor, ein Heterotetramer bestehend aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken kovalent verknüpft sind [203]. Der Insulinrezeptor gehört zu den Rezeptortyrosinkinasen. Während die extrazellulär lokalisierten α -Untereinheiten für die Ligandenbindung verantwortlich sind, verfügen die transmembranären β -Untereinheiten über eine Tyrosinkinaseaktivität [203]. Die Bindung von Insulin an die extrazellulären α -Untereinheiten induziert eine Apposition der katalytischen Domänen der integralen β -Untereinheiten. Nachfolgend kommt es zu einer Transautophosphorylierung der β -Untereinheiten und damit zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase. Daraufhin werden verschiedene Adapterproteine (z.B. Insulinrezeptorsubstrat (IRS) 1) rekrutiert, die an phosphorylierte Tyrosinreste binden [175]. Die Adapterproteine werden anschließend phosphoryliert und induzieren ihrerseits entweder die Bindung weiterer Proteine an Phosphotyrosine über so genannte Src-homology-2- (SH2-) Domänen oder sind enzymatisch aktiv [186].

Die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) bilden eine Familie von Lipidkinasen. Verantwortlich für die Effekte von Insulin und Wachstumsfaktoren ist hauptsächlich die PI3K-Klasse IA [51]. Die PI3K-Klasse IA besteht aus einer regulatorischen p85- und einer katalytischen p110-Untereinheit [43]. Die p85-Untereinheit enthält SH2-Domänen, über die die PI3K an Phosphotyrosinreste von Adapterproteinen wie IRS-1 bindet [175,203]. Dies führt zur Aktivierung der p110-Untereinheit, die daraufhin die Phosphorylierung des Plasmamembranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) an der D3-Position des Inositolrings katalysiert. Hierdurch kommt es zur Konvertierung von PIP2 zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) [28,43].

In Bereichen mit hoher PI3K-Aktivität kommt es zur Assemblierung von Proteinkinase B (auch AKT genannt) und anderen Kinasen, darunter Phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1), die über so genannte Pleckstrin-Homologie-Domänen an PIP3 binden [28,161]. Dabei gelangen AKT und Kinasen wie PDK1 in räumliche Assoziation, so dass AKT phosphoryliert und damit aktiviert wird [28,161]. An der Plasmamembran aktiviertes AKT transloziert anschließend in den Zellkern [5]. Zudem existiert ein kernmembrangebundener Pool von PI3K, der AKT direkt im Nukleus aktivieren kann [184]. Im Zellkern kommt es unter anderem zur Phosphorylierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren [23], die zu den wichtigsten Substraten von AKT zählen [59]. Die Aktivität der PI3K (und damit indirekt die von AKT) kann durch die Substanz LY294002 spezifisch und reversibel inhibiert werden [187].

1.3 FOXO-Transkriptionsfaktoren

1.3.1 Die Familie der Forkhead-Box-Transkriptionsfaktoren

Die Gruppe der humanen FOXO-Transkriptionsfaktoren gehört zur Familie der Forkhead-Box-Transkriptionsfaktoren, einer hochkonservierten Klasse von Proteinen, die in allen eukaryotischen Zellen vorkommt [59]. Gemeinsames Merkmal aller Proteine aus dieser Familie ist die namensgebende Domäne „Forkhead Box“ [89].

Die Erstbeschreibung der Forkhead-Box-Familie erfolgte im Jahr 1989 durch Weigel et al. mit dem Forkhead-Gen der Fliegenart *Drosophila melanogaster*. Der Ausfall dieses Gens führt zum Auftreten abnormer Ektopien im Bereich des Kopfes, die die Form einer

Gabel haben und der Familie ihren Namen gaben [195].

Beim Menschen wurden über 100 verschiedene Forkhead Box Proteine identifiziert. Auf Basis phylogenetischer Analysen der bekannten Gensequenzen wurde im Jahr 2000 durch Kaestner et al. eine bis heute gültige Klassifikation der Fox-Proteine von Vertebraten vorgelegt. Nach dieser werden sequenziell ähnliche Vertreter in die Subgruppen FoxA bis FoxS eingeordnet [89]. Die Klassifikation ist auf der Internetseite <http://biology.pomona.edu/fox/> abrufbar.

Die in der Klassifikation vorgeschlagene Nomenklatur sieht vor, humane Fox-Gene mit Großbuchstaben zu kodieren (z.B. FOXO1). Murine Fox-Gene werden mit einem initialen Großbuchstaben gekennzeichnet (z.B. Foxo1), Gene anderer Chordataspezies werden zusätzlich mit einem kapitalisierten Subgruppenbuchstaben versehen (z.B. FoxO1) [89]. Die Nomenklatur wird jedoch in der Literatur nicht einheitlich verwandt.

Funktionell bildet die Forkhead-Box-Familie eine heterogene Gruppe, deren Vertreter an diversen organischen Prozessen beteiligt sind [110]. Foxe1 beispielsweise ist für die kraniopharyngeale Entwicklung von Bedeutung, Foxi1 ist wichtig für die Formation des vestibulochochleären Systems und FOXP2 wird mit der Sprachentwicklung in Verbindung gebracht [30].

1.3.2 Die Forkhead-Box-Domäne

Die Forkhead-Box, abgekürzt auch „Fox“ oder „FKH-Domäne“, ist ein evolutionär konserviertes Motiv, das in allen Proteinen der Forkhead-Box-Familie vorkommt [140]. Es handelt sich dabei um eine charakteristische Struktur von etwa 110 Aminosäuren Länge, bestehend aus drei Alpha-Helices (H1, H2, H3), die von zwei Schleifen (W1, W2) flankiert werden, was durch den geläufigen Ausdruck „winged helix“ verbildlicht wird (Abbildung 2) [32,110]. Die Forkhead-Box bildet die Grundlage für die Bindung von Forkhead-Box-Transkriptionsfaktoren an die DNA und die Regulation der Transkription. Die DNA-Erkennung wird hauptsächlich durch die Helix H3 vermittelt, indem diese sich in die Große Furche einlagert und über Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte an die jeweilige DNA-Konsensussequenz bindet [140]. An der Stabilisierung des Protein-DNA-Komplexes sind auch weitere Strukturen der Forkhead-Box beteiligt [140].

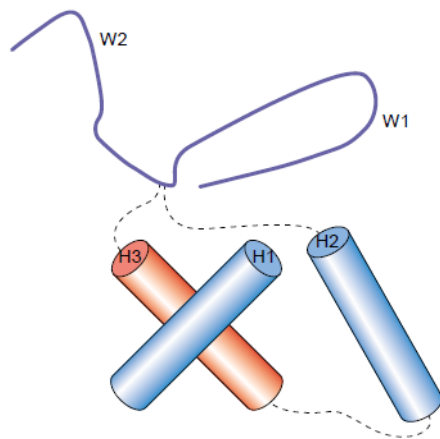


Abbildung 2. Struktur der Forkhead-Box-Domäne (aus [110])

Drei Alpha-Helices (H1, H2, H3) werden von zwei Schleifen (W1, W2) flankiert und bilden die so genannte „winged-helix“-Struktur, die die Bindung von Forkhead-Box-Transkriptionsfaktoren an die DNA vermittelt.

1.3.3 Die Forkhead-Box-Klasse O

Die Familie der humanen Forkhead-Box-Transkriptionsfaktoren der Klasse O (FOXO) umfasst vier Mitglieder [26] (

Tabelle 2). FOXO-Transkriptionsfaktoren sind beteiligt an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse, darunter Differenzierung [10], Metabolismus [66], Zellzyklusarrest [105,124,135,178], DNA-Reparatur [53], oxidative Stressresistenz [104,138] und Apoptose [22,38,127]. Die Helix H3 der Fox-Domäne von FOXO bindet an zwei verschiedene DNA-Konsensussequenzen: 5'-TTGTTTAC-3' (Daf-16 family member-binding element [DBE]) [42,54,198] und 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3' (insulin response element [IRE]) [140]. Zum Teil werden in der Literatur auch die jeweiligen Komplementärsequenzen angegeben, zudem scheint es bei einzelnen Basen Variationen zu geben [17,59,140]. Die DBE-Sequenz wird mit höherer Affinität als die IRE-Sequenz erkannt [140]. An die DNA gebundenes FOXO wirkt als Aktivator der Transkription des jeweiligen Zielgens [26]. Eine Auswahl wichtiger Gene, deren Transkription durch FOXO beeinflusst wird, ist in Tabelle 3 aufgeführt. Für einige Gene ist auch eine transkriptionelle Repression durch FOXO beschrieben [48,152,160]. Aufgrund ihrer gemeinsamen DNA-Konsensussequenzen agieren FOXO-Transkriptionsfaktoren zumindest teilweise untereinander redundant [42].

Tabelle 2. Überblick über die Mitglieder der humanen FOXO-Familie

Name	Alternative Bezeichnungen
FOXO1	FKH1; FKHR; FOXO1A
FOXO3	FOXO3A; FOXO2; AF6q21; FKHRL1; FKHRL1P2; MGC12739; MGC31925; DKFZp781A0677
FOXO4	AFX; AFX1; MLLT7; MGC120490
FOXO6	

Tabelle 3. FOXO-Zielgene (Auswahl)

Bezeichnung	Kategorie	Referenz
Fas Ligand	Apoptose	[22]
Bim	Apoptose	[38]
TRAIL	Apoptose	[127]
P27kip1	G1 Zellzyklusarrest	[124,135]
P130	G1 Zellzyklusarrest	[105]
GADD45	G2 Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur	[53,178]
Cyclin G2	G2 Zellzyklusarrest	[178]
MnSOD	Detoxifikation reaktiver O ₂ -Spezies	[104]
Catalase	Detoxifikation reaktiver O ₂ -Spezies	[138]
Glucose-6-Phosphatase	Metabolismus	[66]
Phosphoenolpyruvatcarboxykinase	Metabolismus	[66]
IGFBP1	Transport von IGF-1	[66]

1.3.4 Regulation von FOXO-Transkriptionsfaktoren

Die Aktivität von FOXO-Transkriptionsfaktoren wird auf Proteinebene durch eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen (PTM) gesteuert. Hierzu zählen Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Acetylierung. Hinzu kommen eine Reihe von Protein-Protein-Interaktionen [37] und Glykosylierung [79]. Aufgrund der großen Varietät an PTM wird derzeit davon ausgegangen, dass nicht eine bestimmte Modifikation für eine bestimmte Funktion steht, sondern vielmehr das Zusammenspiel entscheidend ist [42]. Dieses als „FOXO Code“ beschriebene Muster verschiedener PTM bestimmt das transkriptionelle Programm [26].

Einen schematischen Überblick über die grundlegenden Regulationsmechanismen von FOXO gibt

Abbildung 3. Das bisher noch wenig erforschte Familienmitglied FOXO6 unterliegt grundlegend anderen Mechanismen der Regulation und stellt insofern eine Ausnahme dar [85,100]. FOXO6 ist daher nicht Gegenstand der folgenden Erläuterungen.

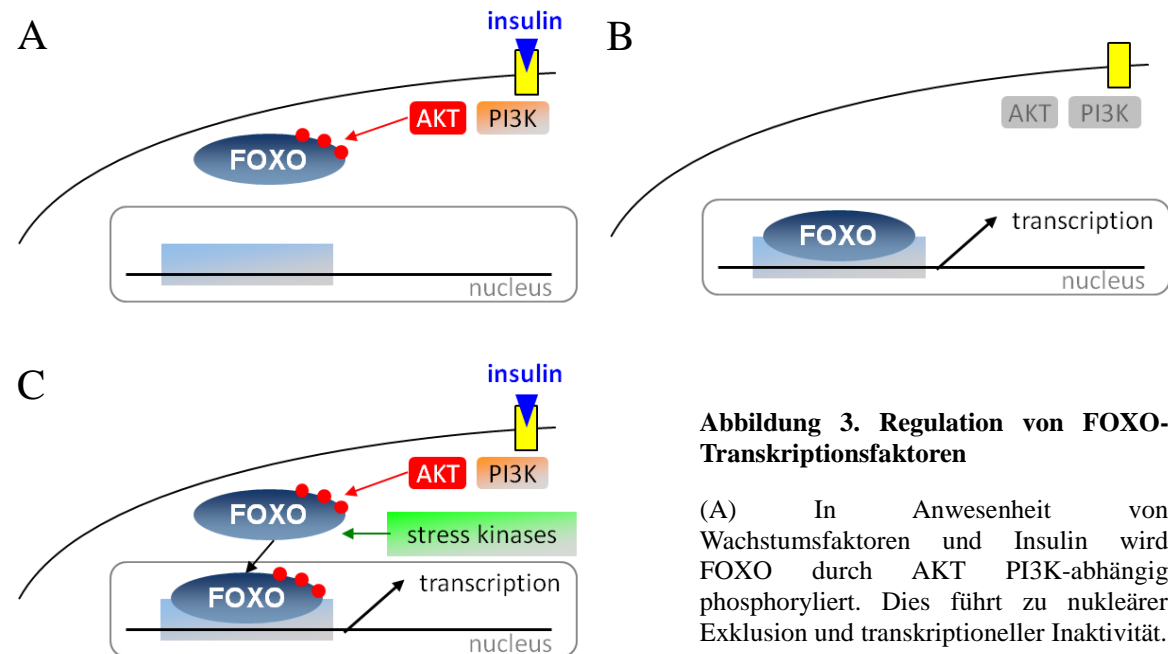


Abbildung 3. Regulation von FOXO-Transkriptionsfaktoren

(A) In Anwesenheit von Wachstumsfaktoren und Insulin wird FOXO durch AKT PI3K-abhängig phosphoryliert. Dies führt zu nukleärer Exklusion und transkriptioneller Inaktivität.

(B) In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren und Insulin bindet FOXO an die DNA-Konsensussequenz und vermittelt die Zielgenexpression.

(C) Unter Einfluss von zellulärem Stress wird FOXO über verschiedene Mechanismen, darunter Stresskinase-vermittelte Phosphorylierung und Inaktivierung von Adapterproteinen, aktiviert und ist transkriptionell aktiv (auch in Anwesenheit von Insulin).

Phosphorylierung

FOXO-Transkriptionsfaktoren sind Substrate einer Reihe von Kinasen, die durch Insulin bzw. Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Als ein zentraler Mechanismus der FOXO-Regulation wird der PI3K-AKT-Signalweg angesehen. [26,59,69,184]. Die Regulation von FOXO über den PI3K-AKT-Signalweg ist evolutionär konserviert [76,184]

In Abwesenheit von Wachstumsstimuli wie Insulin und IGF-1 liegt FOXO im aktivierten Zustand vor, bindet im Zellkern an die DNA und vermittelt die Transkription seiner Zielgene [26,59].

Unter dem Einfluss von Insulin bzw. IGF-1 erfolgt die Aktivierung von AKT durch PI3K wie in Kapitel 1.2 beschrieben. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung von FOXO durch AKT, was in einer Sequestrierung von FOXO im Zytoplasma und damit in einer

Unterbindung der transkriptionellen Aktivität resultiert [18,22,103].

AKT phosphoryliert FOXO an drei sequenziellen Phosphorylierungsstellen, die hier in der Reihenfolge ihrer präferenziellen Phosphorylierung durch AKT [24,133,154] nummeriert sind: Die erste Phosphorylierungsstelle liegt innerhalb der Forkhead Box (bei FOXO1: Ser256; bei FOXO3: Ser253) und überlappt mit dem so genannten Nuclear localization signal (NLS)-Motiv; die zweite Phosphorylierungsstelle befindet sich im N-terminalen Bereich (bei FOXO1: Thr24; bei FOXO3: Thr32), eine weitere liegt C-terminal (bei FOXO1: Ser319; bei FOXO3: Ser315) [59,81]. Alle drei genannten Stellen beeinflussen im phosphorylierten Zustand die Funktion von FOXO in erster Linie durch die Rekrutierung von 14-3-3-Proteinen [22,23]. 14-3-3-Proteine sind eine Klasse von Adaptermolekülen, die die Funktion von Proteinen durch Bindung an phosphorylierte Zielsequenzen modulieren [130,183]. Durch Bindung von 14-3-3 an FOXO kommt es zur Maskierung des NLS und daraus resultierend zur Translokation in das Zytosol [23,141,208]. Zusätzlich wird die DNA-Bindung durch 14-3-3 behindert [184]. Die AKT-vermittelte Inhibition von FOXO kann durch PI3K-Inhibitoren wie LY294002 aufgehoben werden, resultierend in nukleärer Akkumulation von FOXO [204].

Analog zu AKT erfolgt die Regulation von FOXO über Serum-and-glucocorticoid-inducible kinases (z.B. SGK-1). SGK-1 unterliegt wie AKT der Regulation durch den PI3K-Signalweg und phosphoryliert FOXO an den gleichen Stellen (jedoch mit unterschiedlicher Präferenz) [24]. Über SGK-1 hemmen beispielsweise Glukokortikoide die Aktivität von FOXO3 [197]. Darüber hinaus existieren auch andere Signalprozesse, die durch Phosphorylierung von FOXO inhibierend wirken, darunter I κ B-kinase und Proteinkinase A; im Gegensatz zur Regulation über den PI3K-Signalweg sind diese jedoch zumeist spezifisch für einzelne FOXO-Subtypen [26,80,81,184].

Neben den genannten Mechanismen, die FOXO phosphorylierungsabhängig inhibieren, existieren weitere, die aktivierenden Einfluss ausüben [81]. Diese Signalprozesse werden überwiegend induziert durch verschiedenen Stressreize wie reaktive Sauerstoffspezies oder DNA-Schädigung [81]. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die beschriebenen Mechanismen der Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren durch Stresskinasen die inhibierenden Mechanismen des PI3K-Signalwegs übertreffen und somit auch in Anwesenheit von Insulin und Wachstumsfaktoren zur Aktivität von FOXO führen [26,59].

Der Prototyp dieser Regulatoren ist die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK). JNK gehört zu den MAP-Kinasen und wird unter anderem durch eine Vielzahl von Stimuli, darunter

oxidativer Stress, TLR-Aktivierung und Zytokine aktiviert [9,44]. Die JNK-abhängige Regulation von FOXO ist ähnlich wie die über den PI3K-AKT-Signalweg evolutionär konserviert [81].

In Antwort auf die genannten Stimuli phosphoryliert JNK FOXO4 direkt, wodurch es zur nukleären Akkumulation und transkriptionellen Aktivität kommt [44]. Obwohl diese Art der direkten Phosphorylierung für die Subtypen FOXO1 und FOXO3 bisher nicht *in vivo* gezeigt werden konnte, führt JNK auch hier zu einer Aktivierung [81]. Tatsächlich ist JNK dazu in der Lage, 14-3-3 zu phosphorylieren [181,202], wodurch die Interaktion mit FOXO unterbunden wird [170]. Somit ist FOXO trotz Phosphorylierung durch AKT transkriptionell aktiv [59]. Zudem hemmt JNK die Aktivität von AKT, wodurch es zu einer verminderten Phosphorylierung und erhöhter Aktivität von FOXO kommt [171].

Ein weiterer Aktivator von FOXO ist die Ste20-like kinase-1 (MST-1). MST-1 phosphoryliert FOXO-Transkriptionsfaktoren bei oxidativem Stress an einer konservierten Phosphorylierungsstelle innerhalb der Forkhead-Domäne. Dadurch kommt es zur Unterbrechung der Bindung von FOXO und 14-3-3, wodurch FOXO aktiviert wird [111].

Ein anderer Stressfaktor, der zur Aktivierung von FOXO führt, ist Energiemangel [42,61]. Bei einem hohen Verhältnis von Adenosinmonophosphat zu Adenosintrisphosphat kommt es zur Aktivierung der Adenosinmonophosphat-activated protein kinase (AMPK). AMPK phosphoryliert FOXO an mehreren Serinresten. Dies führt, anders als beispielsweise bei JNK, nicht zu Veränderungen der subzellulären Lokalisation, sondern aktiviert durch Änderungen des Acetylierungsstatus im Zusammenspiel mit anderen aktivierenden Faktoren ein bestimmtes transkriptionelles Programm [42,191].

Ubiquitinierung

Neben den transienten Regulationsmechanismen der subzellulären Lokalisation und Funktion von FOXO erfolgt eine Regulation der absoluten FOXO-Proteinmenge durch Proteindegradation. Durch das Zusammenwirken von Abbau und De-novo-Synthese kommt es zu einem kontinuierlichen Umsatz von FOXO, wobei die mittlere Lebensdauer eines FOXO-Moleküls ca. 9-10 Stunden beträgt [78].

Die Degradation von FOXO wird durch Polyubiquitinierung und anschließenden Abbau im Proteasom vermittelt [82]. Die Polyubiquitinierung von FOXO wird durch verschiedene Phosphorylierungen hervorgerufen. Auch hier spielt die durch Insulin oder Wachstumsfaktoren vermittelte PI3K-AKT-abhängige Phosphorylierung eine zentrale

Rolle [8,121,149]. Polyubiquitinierung kann jedoch auch über Phosphorylierung durch weitere Kinasen vermittelt werden, darunter IKK [80] und ERK [201]. Die Polyubiquitinierung erfolgt durch E3-Ligasen wie MDM2 (murine double minute 2) [21,52,201] oder den SCF-SKP2-Proteinkomplex [82,190].

Die initiale Monoubiquitinierung erfolgt durch MDM2 und resultiert zunächst in einer Aktivierung von FOXO4 und wahrscheinlich auch FOXO3 [78,82]. Bei starker MDM2-Aktivität wird FOXO jedoch anschließend weiter polyubiquitiniert und degradiert [82]. Ebenso ist es möglich das die monoubiquitiniertes FOXO durch SKP2 in die polyubiquitinierte Form überführt wird [21].

Acetylierung

Acetylierung vermittelt die Regulation von FOXO unter Stressbedingungen [60,188].

Unter oxidativen Stressbedingungen nukleär lokalisiertes FOXO bildet einen Komplex mit diversen Proteinen mit Histon-Acetylase-Aktivität, darunter CBP, p300 und PCAF [81,188]. Dies führt zunächst zur Acetylierung von FOXO, wodurch die transkriptionelle Aktivität zeitweilig reduziert wird [188]. Anschließend kommt es (ebenfalls in Abhängigkeit von oxidativem Stress) zur Rekrutierung der Deacetylase SIRT1, die FOXO an verschiedenen Stellen deacetyliert [25,36,77,101,131].

Der genaue Stellenwert dieser Regulation in bislang nicht vollständig verstanden, jedoch weisen mehrere Studien darauf hin, dass durch die SIRT1-vermittelte Deacetylierung das transkriptionelle Programm von FOXO von Apoptose in Richtung Stressresistenz, Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur verschoben wird [25,77,131].

1.3.5 FOXO-Transkriptionsfaktoren und angeborene Immunität

DAF-2 ist das *Caenorhabditis-elegans*-Ortholog des humanen IGF-1-Rezeptors, dessen Aktivierung wie in den Kapiteln 1.2 und 1.3.4 beschrieben zur PI3K-abhängigen Deaktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren führt. Loss-of-function-Mutanten für DAF-2 zeigten eine verlängerte Lebensdauer, was in erster Linie auf die Aktivierung des FOXO-Transkriptionsfaktors DAF-16 zurückgeführt wird [40,98,115,142]. Seither wurden FOXO-Transkriptionsfaktoren vielfach mit Langlebigkeit in Verbindung gebracht [50,97,99]. Neben den genannten Studien an *C. elegans* konnte eine Beteiligung von

FOXO an der Regulation der Lebensspanne auch in *D. melanogaster* gezeigt werden [56,84]. Der Einfluss von FOXO auf die Lebensspanne von Mäusen wurde bislang nicht systematisch untersucht [117], jedoch scheinen die evolutionär hochkonservierten IGF-1- bzw. insulinabhängigen Signalprozesse bei der Maus ebenfalls Einfluss auf den Alterungsprozess zu nehmen [99,117]. Darüber hinaus sind auch beim Menschen bestimmte Polymorphismen von FOXO1 und FOXO3 mit Langlebigkeit assoziiert, wie in einer Reihe von Studien an unterschiedlichen Kollektiven nachgewiesen werden konnte [6,50,112,118,145,196].

Als in Frage kommende Ursachen, die der durch Aktivierung von FOXO verlängerten Lebensdauer zugrunde liegen, werden entsprechend der vielfältigen FOXO-Zielgene eine Reihe von Mechanismen diskutiert. Hierzu zählt neben Aspekten wie der Tumorsuppression [200] und zellulären Stressresistenz [59] auch die Beeinflussung des angeborenen Immunsystems [126,180]. DAF-2-defiziente *C. elegans* sind neben ihrer Langlebigkeit durch eine Resistenz gegen bakterielle Pathogene gekennzeichnet [55,166]. Diese Resistenz wird durch den FOXO-Transkriptionsfaktors DAF-16 vermittelt [55]. Übereinstimmend damit führt auch DAF-16-Überexpression zur Resistenz gegen bakterielle Infektionen [167]. Um entsprechenden Mechanismen der angeborenen Immunität zu entgehen, verfügen Pathogene wie *P. aeruginosa* über die Möglichkeit, DAF-16 in Abhängigkeit von DAF-2 zu inhibieren [46,96]. Zur Charakterisierung des Einflusses einer Aktivierung von DAF-16 auf die Genexpression wurden DNA-Mikroarrayanalysen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass in DAF-2-Mutanten mehrere Gene antimikrobieller Peptide hochreguliert sind [45,132]. In ähnlicher Weise führt die Aktivierung von dFoxo in *D. melanogaster* zur Induktion der Expression verschiedener antimikrobieller Peptide [14]. dFoxo bindet hierbei direkt an regulatorische DNA-Sequenzen und fungiert somit als Aktivator der Transkription [14]. Analog dazu ist die Expression antimikrobieller Peptide bei dFoxo-defizienten Fliegen herabgesetzt [14]. Eine Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren nach bakterieller Infektion wurde bisher sowohl in *C. elegans* [7,192] als auch in *D. melanogaster* [189] nachgewiesen. Hier vermittelt dFoxo epitheliale Remodelingprozesse bei Infektionen der Atemwege [189]. Zudem wurde gezeigt, dass DAF-16 durch Infektion mit fungalen Pathogenen aktiviert wird und eine wichtige Rolle für die epitheliale angeborene Immunität der Epidermis von *C. elegans* spielt [210].

Über die Arbeiten an typischen Modellorganismen hinausgehend liegen auch verschiedene Studien vor, die auf eine Beteiligung von FOXO in der angeborenen

Immunität des Menschen hinweisen. Becker et al. konnten zeigen, dass die Expression von Defensinen in verschiedenen humanen Zellkulturmodellen durch Insulin gehemmt und durch Inhibition des Insulinsignalwegs erhöht werden kann [14]. Des weiteren regulieren FOXO-Transkriptionsfaktoren inflammatorische Prozesse durch Induktion der Expression von IL-1 β [169] und TLR4 [47] in humanen Makrophagen. In einer Studie von Over et al. wurde gezeigt, dass IRAK4 die Aktivierung von FOXO3 induziert und dadurch Monozyten mit einen proinflammatorischen Phänotyp generiert werden [143].

1.4 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion von FOXO-Transkriptionsfaktoren bei Reaktionen des Atemwegsepithels im Rahmen der angeborenen Immunität zu untersuchen. Das Verhalten von FOXO in Reaktion auf infektiöse Stimuli sollte in verschiedenen *in-vivo*- und *in-vitro*-Modellen charakterisiert werden.

Mit Hilfe FOXO-defizienter Atemwegsepithelzellen sollten Hinweise auf die Beteiligung von FOXO-Transkriptionsfaktoren an Mechanismen der angeborenen Immunantwort gewonnen werden. Es sollten dabei sowohl die konstitutive immunologische Hintergrundaktivität als auch die Reaktion auf Infektion mit Pathogenen wie *H. influenzae* und *P. aeruginosa* evaluiert werden. Zudem sollten die Prozesse der Signaltransduktion identifiziert werden, über die FOXO an der Vermittlung angeborener Immunreaktionen in Atemwegsepithelzellen beteiligt ist.

Ein weiteres Ziel der Studie bestand darin, in diesem Zusammenhang die Interaktion von FOXO und Insulin zu untersuchen, insbesondere im Hinblick auf mögliche immunsuppressive Wirkungen von Insulin.

Zur Evaluation der klinischen Relevanz sollte darüber hinaus geprüft werden, ob im Rahmen akuter und chronischer Infektionen der Atemwege Änderungen in der Aktivität von FOXO-Transkriptionsfaktoren zu beobachten sind.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 4. Verwendete Geräte

Gerät/Anwendung	Produktname	Hersteller
ELISA-Reader	Ultra 384	Tecan
ELISA-Washer	Nunc Immuno Wash 8	Thermo Fisher Scientific
Mikroskop	BX51	Olympus
Photometrie	Ultrospec 2100 pro	GE Healthcare
Messung der RNA-Konzentration	NanoDrop 8000	Thermo Fisher Scientific
qRT-PCR	iCycler	Bio-Rad
cDNA-Synthese	myCycler	Bio-Rad
Kühlzentrifuge	Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1,0R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Heraeus Biofuge Pico	Thermo Fisher Scientific
Hitzeblock	BT 130-1	HLC
Waage	EW 4200-2NM	Kern
Waage	EW 420-3NM	Kern
Waage	ALS 120-4	Kern
Schlittenmikrotom	SM2000R	Leica

2.2 Software

Tabelle 5. Verwendete Software

Anwendung	Programm	Hersteller
ELISA	Magellan	Tecan
Bildverarbeitung	ImageJ 1.44p	National Institutes of Health
Statistik	Prism 5	GraphPad Software Inc.
Tabellenkalkulation	OpenOffice.org Calc 3.4	Apache Software Foundation
Bildaufnahme	Cell Sense Dimension	Olympus
Messung der RNA-Konzentration	NanoDrop 8000 V2.0	Thermo Scientific

2.3 Tierversuche

Für die Tierversuche wurden 6-8 Wochen alte C57BL/6N-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden im Tierstall des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen gehalten. Sämtliche Tierversuche wurden durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes genehmigt.

Für die Untersuchungen am murinen Pneumoniemodell [16] wurden die Mäuse zunächst durch intraperitoneale Injektion von jeweils 2,6 mg Ketaminhydrochlorid (*Ketanest*, Pfizer) und 0,18 mg Xylazinhydrochlorid (*Rompun*, Bayer) anästhesiert und an den Schneidezähnen an einem Draht aufgehängt. Anschließend erfolgte in 10 µl-Schritten die intranasale Applikation von insgesamt jeweils 40 µl hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* PAO1 in PBS (10^7 CFU/ml), lebenden NTHi in PBS (10^7 CFU/ml) oder PBS allein als Kontrolle. 3 Stunden nach Infektion wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von jeweils 13 mg Ketaminhydrochlorid und 0,9 mg Xylazinhydrochlorid getötet. Die Lungen und unteren Atemwege wurden en-bloc explantiert. Für immunhistochemische Analysen wurden die Präparate in Formalin fixiert. Für die RNA-Isolation wurden die Lungen in PBS homogenisiert.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kultivierung von Calu-3-Zellen

Die humane Bronchialepithelzelllinie Calu-3 entstammt ursprünglich einem Adenokarzinom eines 25-jährigen kaukasischen Mannes. Sie ist in der Literatur als valides Modell für das Bronchialepithel beschrieben, insbesondere im Hinblick auf immunologische Fragestellungen [209]. Calu-3-Zellen wurden in DMEM/F12 (*Gibco DMEM/F12*, Life Technologies) mit 10% FBS (*Gibco Fetal Bovine Serum*, Life Technologies), 100 IU/ml Penicillin G und 100 IU/ml Streptomycin (*Gibco Pen Strep* (10000 U/ml), Life Technologies, 1:100 v/v verdünnt) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Vor dem Start von Experimenten wurden die Zellen über Nacht in serumfreiem DMEM/F12 inkubiert. Alle Experimente mit Calu-3-Zellen wurden in serumfreiem DMEM/F12 durchgeführt.

2.4.2 Kultivierung primärer humaner Bronchialepithelzellen (HBEC)

Im Rahmen von operativen Eingriffen bei Bronchialkarzinom, die an der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie der Universitätsklinik des Saarlandes durchgeführt wurden, wurden Resektate aus dem tumorfreien Absetzungsrand gewonnen. Aus diesen Resektaten wurden nach internem Protokoll [11] HBEC isoliert. Das Verfahren wurde durch die Ethikkommission der Landesärztekammer des Saarlandes genehmigt. Informed Consent der Patienten lag vor. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in *Airway Epithelial Cell Growth Medium* mit Supplement Kit (PromoCell) kultiviert. Im Supplement Kit sind einzeln enthalten (in Klammern Endkonzentration im Medium): bovine pituitary extract (0,004 ml/ml), epidermal growth factor (recombinant human, 10 ng/ml), insulin (recombinant human, 5 µg/ml), hydrocortisone (0,5 µg/ml), epinephrine (0,5 µg/ml), triiodo-L-thyronine (6,7 ng/ml), transferrin holo (human, 10 µg/ml) und retinoic acid (0,1 ng/ml).

2.5 Bakterien

2.5.1 Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi)

NTHi aus Glycerinstocks wurde auf Chocolate-Agarplatten (*BD BBL Chocolate II Agar (GC II Agar) with Hemoglobin and BD IsoVitaleX*, Becton Dickinson and Company) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Mit Hilfe einer Impföse wurden die Bakterien von der Platte entnommen, zum Waschen in PBS aufgenommen und 10 Minuten bei 3500 U/min abzentrifugiert. Das PBS wurde verworfen und die Bakterien in frischem PBS resuspendiert.

Für Zellkulturexperimente mit lebenden NTHi wurde die OD_{600nm} auf 0,5 eingestellt, was ca. 5×10^8 CFU/ml entspricht. Die Bakterien wurden erneut abzentrifugiert und in DMEM/F12 oder *Airway Epithelial Cell Growth Medium* aufgenommen.

Für Zellkulturexperimente mit inaktivierten NTHi wurde die OD_{600nm} auf 0,5 eingestellt, was ca. 5×10^8 CFU/ml entspricht. Die Bakterien wurden erneut abzentrifugiert und in DMEM/F12 mit 100 IU/ml Penicillin G und 100 IU/ml Streptomycin aufgenommen und vor Beginn des Versuch 60 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert.

Zur Bestimmung des NTHi-Titers wurden jeweils geeignete Verdünnungen auf

Chocolate-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.5.2 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

LB-Medium (Carl Roth) und LB-Agar (Carl Roth) wurden nach Anleitung des Herstellers angesetzt und autoklaviert. Anschließend wurde zur Herstellung von LB-Agarplatten 60-65°C warmer LB-Agar in Petrischalen übertragen (25 ml pro Petrischale). *P. aeruginosa* PAO1 aus Glycerinstocks wurde auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe einer Impföse wurden die Bakterien von der Platte entnommen, in LB-Medium resuspendiert und anschließend für 2-4 Stunden bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Bakterien 10 Minuten bei 3500 U/min abzentrifugiert. Das LB-Medium wurde verworfen. Die Bakterien wurden zum Waschen in PBS resuspendiert, erneut abzentrifugiert und erneut in PBS resuspendiert. Die OD_{600nm} wurde auf 1 eingestellt. Anschließend wurden die Bakterien für 10 Minuten bei 95°C hitzeinaktiviert. Stocks wurden bei -80°C eingefroren.

Für Zellkulturexperimente wurde die Stocklösung 1:100 in DMEM/F12 verdünnt, entsprechend einer OD_{600nm} von 0,01.

2.6 siRNA-Transfektion

Calu-3-Zellen oder HBEC wurden mit unspezifischer control-siRNA (scrambled sequence) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA transfiziert (s. Tabelle 6). Dabei wurde pro Well einer 12-well-Platte wie folgt vorgegangen: 200 µl *OPTI-MEM I Medium* (Life Technologies) ohne Serum wurden in das Well pipettiert. Hinzu wurden 20 pmol control-siRNA bzw. jeweils 10 pmol FOXO1- und FOXO3-siRNA pipettiert und vorsichtig untergemischt. Die entstandene Lösung wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 µl *Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent* (Life Technologies) addiert und vorsichtig untergemischt. Die entstandene Lösung wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden im jeweiligen Standardmedium ohne Antibiotika aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf ca. 250-300 Tsd. Zellen eingestellt. 1 ml der

Zellsuspension wurde zur Transfektionslösung hinzugegeben. Die Zellen wurden vor dem Beginn der Durchführung von Experimenten für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Effektivität des FOXO1/3-silencing wurde mittels qRT-PCR evaluiert.

Tabelle 6. Verwendete siRNA-Produkte

	Produktname	Hersteller
control-siRNA	Signal Silence Control siRNA (unconjugated)	Cell Signaling Technologies
FOXO1-siRNA	Signal Silence FoxO1 siRNA I	Cell Signaling Technologies
FOXO3-siRNA	Signal Silence FoxO3a siRNA I	Cell Signaling Technologies

2.7 Stimulationsexperimente

2.7.1 Stimulation mit Bakterien

Die Bakterien wurden vorbereitet wie in Kapitel 2.5 beschrieben. Calu-3-Zellen wurden transfiziert wie in Kapitel 2.6 beschrieben. 24 Stunden nach Transfektion wurde der Versuch gestartet. Die Zellen wurden zunächst über Nacht in DMEM/F12 ohne Serum und Antibiotika inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit bakterienhaltigem Medium behandelt.

Bei Experimenten mit lebenden NTHi wurden die Zellen für 4 Stunden mit der Suspension von lebenden NTHi in DMEM/F12 ($OD_{600nm} \approx 0,5$) behandelt. Bei Experimenten mit antibiotikainaktivierten NTHi wurden die Zellen für 24 Stunden mit der Suspension von NTHi in DMEM/F12 ($OD_{600nm} \approx 0,5$) mit 100 IU/ml Penicillin G und 100 IU/ml Streptomycin behandelt. Bei Experimenten mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* PAO1 wurden die Zellen für 4 Stunden mit der Suspension von hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* PAO1 in DMEM/F12 ($OD_{600nm} \approx 0,01$) behandelt. Kontrollen wurden jeweils mit reinem DMEM/F12 behandelt.

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellkulturüberstände entnommen und bis zur ELISA-Messung bei -80°C eingelagert. Die Zellen wurden mit Hilfe des Puffers RA1 aus dem RNA-Isolationskit *NucleoSpin RNA II* lysiert. Das Lysat wurde bis zur RNA-Isolation bei -80°C eingelagert.

2.7.2 Stimulation mit TLR-Agonisten und Zytokinen

Calu-3-Zellen wurden wie in Kapitel 2.6 beschrieben transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde der Versuch gestartet. Die Zellen wurden zunächst über Nacht in DMEM/F12 ohne Serum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden mit in DMEM/F12 gelösten TLR-Agonisten bzw. Zytokinen behandelt (s. Tabelle 7). Kontrollen wurden jeweils mit reinem DMEM/F12 behandelt.

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellkulturüberstände entnommen und bis zur ELISA-Messung bei -80°C eingelagert. Die Zellen wurden mit Hilfe des Puffers RA1 aus dem RNA-Isolationskit *NucleoSpin RNA II* lysiert. Das Lysat wurde bis zur RNA-Isolation bei -80°C eingelagert.

Tabelle 7. Konzentrationen der eingesetzten Immunstimulatoren

Substanz	Handelsname, Hersteller	Arbeitskonzentration
Flagellin	<i>FLA-BS</i> , InvivoGen	1 µg/ml
IL-1β	<i>Recombinant Human IL-1 beta/IL-1F</i> , R&D	1 ng/ml
Poly(I:C)	<i>Poly(I:C) LMW</i> , InvivoGen	1 µg/ml

2.8 RNA-Isolation

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des RNA-Isolationskits *NucleoSpin RNA II* (Macherey-Nagel) nach Anleitung des Herstellers. Die Isolation von Gesamt-RNA aus Lungenhomogenisaten erfolgte mit Hilfe RNA-Isolationskits *TRIzol Plus RNA Purification System* (Life Technologies) nach Anleitung des Herstellers. Die Protokolle beinhalteten eine on-column-DNase-Behandlung zur Entfernung genomischer DNA. Mit Hilfe eines UV-Vis-Spektrophotometers wurde die RNA-Konzentration im Isolat bestimmt. Die Reinheit der RNA-Isolate wurde anhand des Quotienten A260 nm/A280 nm beurteilt.

2.9 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Kits *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (ThermoFisher Scientific) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dabei erfolgte die Reverse Transkription von 1 µg RNA pro Ansatz unter Verwendung von Oligo-(dT)₁₈-Primern.

2.10 Quantitative Real-time-PCR

Die quantitative Real-time-PCR erfolgte unter Verwendung des SYBR-Green-Reaktionsmix *SensiMix SYBR & Fluorescein Kit* (Bioline) nach Anleitung des Herstellers. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgelistet. Alle Primer wurden synthetisiert durch die Firma Metabion. Folgendes PCR-Protokoll wurde verwendet: 10 Minuten bei 95°C; 40 Zyklen mit 15 Sekunden bei 95°C und 45 Sekunden bei 60°C; 1 Minute bei 95°C; 1 Minute bei 55°C. Die Spezifität der Amplifikation wurde durch Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate überprüft. Die relative Genexpression wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode [147] unter Verwendung von β -Actin als internem Standard bestimmt.

Tabelle 8. Verwendete Primer

Zielgen	Forward-Primer	Reverse-Primer
β -Actin	5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'
FOXO1	5'-TGGACATGCTCAGCAGACATC-3'	5'-TTGGGTCAGGCGGTTCA-3'
FOXO3	5'-AAATGTTTCGTCGCGGCGGAAC-3'	5'-GTCGCCCTTATCCTTGAAGTA-3'
hBD-2	5'-TCAGCTCCTGGTGAAGCTC-3'	5'-GGGCAAAAGACTGGATGACA-3'
IP-10	5'-TGAAATTATTCCTGCAAGCCAA-3'	5'-CAGACATCTCTTCTCACCCTTCTTT-3'
IL-6	5'-CACACAGACAGCCACTCACC-3'	5'-TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT-3'
TNF	5'-CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC-3'	5'-AGCTGCCCCTCAGCTTGA-3'
Bim	5'-CCGCCCTTATGATGAAGTGT-3'	5'-AAAGCCTGGAGTCAGCAAAA-3'
TLR3	5'-CCTGCAGCTGACTAGGAAC-3'	5'-TGCTGCAAATCGAGAATTT-3'

2.11 Transkriptionsfaktorbindeassay

Calu-3-Zellen wurden in 100-mm-Petrischalen kultiviert. Die Zellen wurden über Nacht ohne Serum inkubiert und anschließend für 30 Minuten mit lebenden NTHi in DMEM/F12 (s. Kapitel 2.5.1) infiziert. Kontrollen wurden nicht infiziert. Kernextrakte wurden mit Hilfe des *Nuclear Extract Kits* (Active-Motif) nach Anleitung des Herstellers präpariert. Die relative DNA-Bindeaktivität von FOXO1 in den Kernextrakten wurde mit Hilfe des Kits *TransAM FKHR (FOXO1)* (Active-Motif) nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Hierbei werden äquivalente Mengen an nukleärem Protein aus Kernextrakten auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Diese ist mit Oligonukleotiden beschichtet, die die FOXO-Konsensussequenz enthalten. Transkriptionell aktives FOXO1 bindet an die Konsensussequenz und wird dadurch auf der Mikrotiterplatte immobilisiert. Da transkriptionell inaktives FOXO1 nicht an DNA bindet, wird es nicht immobilisiert und kann durch Waschung entfernt werden. Anschließend erfolgt die Detektion von immobilisiertem FOXO1 über einen Anti-FOXO1-Antikörper. Dieser wird wiederum mit einem Anti-IgG-Antikörper detektiert, der mit Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Die relative DNA-Bindeaktivität im Kernextrakt wird durch die enzymatische Reaktion nachgewiesen. Die Messung der Absorption bei 450 nm erfolgte mit Hilfe eines *Tecan Ultra 384 ELISA-Readers* und der Software *Magellan*.

2.12 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und IP-10 in Zellkulturüberständen wurde mit Hilfe kommerziell verfügbarer ELISA-Kits nach Anleitung des Herstellers bestimmt (s. Tabelle 9). Die Absorptionsmessung erfolgte mit Hilfe eines *Tecan Ultra 384 ELISA-Readers* und der Software *Magellan*.

Tabelle 9. Verwendete ELISA-Kits

	Produktname	Hersteller
IL-6 ELISA	Human IL-6 DuoSet	R&D Systems
IL-8 ELISA	Human CXCL8/IL-8 DuoSet	R&D Systems
IP-10 ELISA	Human CXCL10/IP-10 DuoSet	R&D Systems

2.13 NTHi-Internalisierungsassay

Zellen wurden auf 12-well-Platten kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit antibiotikafreiem Medium gewaschen und über Nacht in Medium ohne Antibiotika und Serum (Calu-3) bzw. Insulin (HBEC) inkubiert. Lebende NTHi wurden wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben präpariert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit NTHi-haltigem Medium behandelt. Nach 120 Minuten Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das NTHi-haltige Medium abgesaugt. Die Zellen wurden zur groben Entfernung extrazellulärer Bakterien dreimal mit warmem PBS gewaschen, anschließend für weitere 45-60 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ in Anwesenheit von Gentamicin (Life Technologies) in einer Konzentration von 50 µg/ml in Zellkulturmedium inkubiert. Hierbei wurden verbliebene extrazelluläre Bakterien abgetötet. Danach wurden das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit warmem PBS gewaschen, um verbliebenes Gentamicin zu entfernen. Die Zellen wurden mit 1% Saponin (Sigma-Aldrich) in PBS lysiert. Geeignete Verdünnungen der Zelllysate wurden auf Chocolateagar ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anhand der Anzahl an CFU auf den Platten wurde der intrazelluläre NTHi-Titer bestimmt.

Abbildung 4 gibt einen schematischen Überblick über den Ablauf des NTHi-Internalisierungsassays. Das genaue experimentelle Vorgehen bei den verschiedenen durchgeführten Experimenten ist in den Bildunterschriften von Abbildung 13 und Abbildung 25 dokumentiert. Zur Inhibition der PI3K während der Experimente wurde LY294002 (Cell Signaling Technology) verwendet wie in den Bildunterschriften von Abbildung 13 und Abbildung 25 beschrieben.

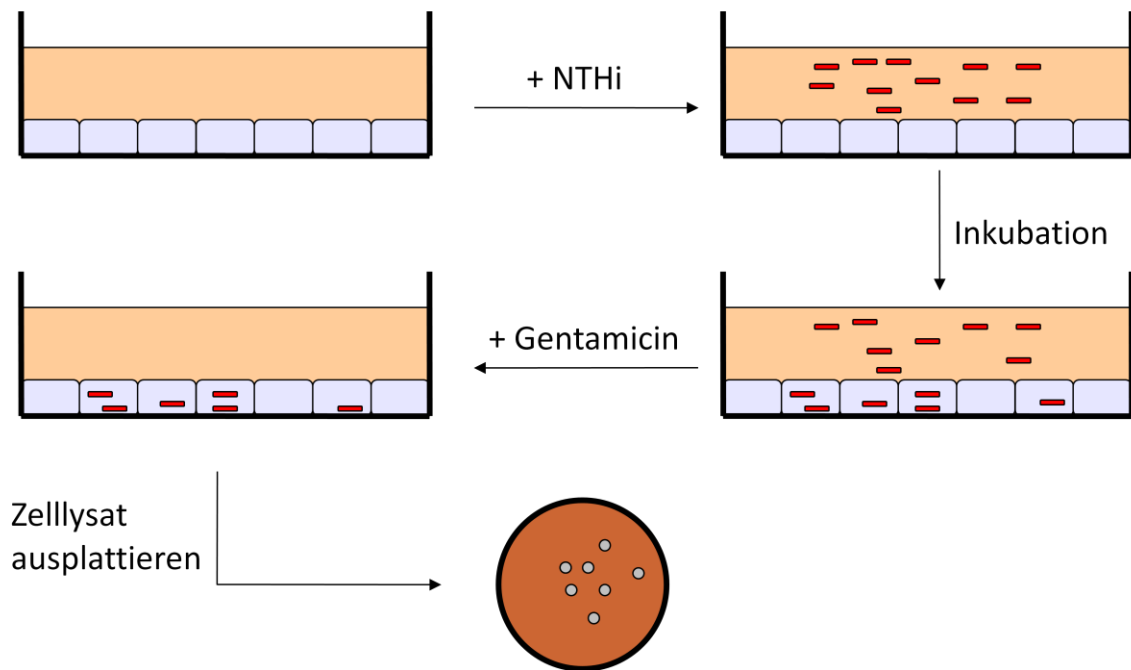


Abbildung 4. NTHi-Internalisierungssassay

Monolayer von Atemwegsepithelzellen werden mit Medium versetzt, das lebende NTHi beinhaltet. Im Verlauf der Inkubationszeit gelangen Bakterien in das Innere der Zellen. Durch Hinzugabe des Antibiotikums Gentamicin werden extrazelluläre Bakterien abgetötet. Anschließend erfolgen die Lysierung der Zellen mit Saponin und der kulturelle Nachweis des intrazellulären Bakterientiters.

2.14 LDH-Zytotoxizitätsassay

Zur Überprüfung unter den Versuchsbedingungen in Zellkultur möglicherweise auftretender zytotoxischer Effekte wurde ein LDH-Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Hierfür wurde das kommerziell verfügbare *LDH Cytotoxicity Assay Kit II* (Abcam) verwendet. Die Zellen wurden behandelt wie in Abbildung 21 beschrieben. Anschließend erfolgten die Gewinnung der Zellkulturüberstände und die Durchführung des LDH-Zytotoxizitätsassays nach Anleitung des Herstellers. Als Negativkontrolle (LowCtrl) diene reines Zellkulturmedium, als Positivkontrolle (HiCtrl) mit Hilfe der „cell lysis solution“ aus dem Kit hergestellte Zelllysate. Die Messung der OD_{450nm} erfolgte photometrisch mit Hilfe eines *Tecan Ultra 384* ELISA-Readers und der Software *Magellan*. Die prozentuale Zytotoxizität wurde bestimmt mit Hilfe der Formel:

$$\frac{[\text{OD}_{450\text{nm Probe}}] - [\text{OD}_{450\text{nm LowCtrl}}]}{[\text{OD}_{450\text{nm HiCtrl}}] - [\text{OD}_{450\text{nm LowCtrl}}]} * 100$$

2.15 Immunfluoreszenzmikroskopie

HBEC wurden auf *Nunc LabTek Chamberslides* (ThermoFisher Scientific) kultiviert. Die Zellen wurden über Nacht in Medium ohne Insulin inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten in Medium mit Insulin [5 µg/ml] oder ohne Insulin inkubiert. Anschließend erfolgte bei gleichbleibender Insulinkonzentration die Stimulation mit Poly-(I:C) [1 µg/ml] für 60 Minuten.

Calu-3-Zellen wurden auf *Nunc LabTek Chamberslides* kultiviert. Die Zellen wurden über Nacht in Medium ohne Serum inkubiert und anschließend für 60 Minuten mit lebenden NTHi in DMEM/F12 (s. Kapitel 2.5.1) stimuliert.

Nach Abschluss des Versuchs wurde das Medium verworfen. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit 4% Formaldehyd in PBS fixiert und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Membran und Blockierung unspezifischer Bindestellen wurden die Zellen für 60 Minuten in PBS mit 1% BSA (*Albumin Fraktion V, proteasefrei*, Carl Roth) und 0,1% Tween-20 (Applichem) behandelt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper *Anti-FOXO3A antibody (ab47409)* (Abcam) (1:1000 v/v verdünnt in PBS mit 1% BSA und 0,1% Tween-20) behandelt. Der verwendete Antikörper ist kreuzreaktiv für humanes und murines FOXO3. Danach wurden die Zellen dreimal 10 Minuten mit PBS gewaschen und für 60 Minuten mit dem TRITC-gekoppelten Sekundärantikörper *polyclonal swine anti-rabbit TRITC* (Dako) und *AlexaFluor 488 Phalloidin* (Life Technologies) (verdünnt in PBS mit 1% BSA und 0,1% Tween-20) inkubiert. Nach 60 Minuten wurden die Zellen erneut dreimal 10 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Kammern der Chamberslides entfernt, die Zellen mit *Fluorescence Mounting Medium* (Dako) behandelt, eingedeckt und mikroskopiert. Die Analyse der Bilder und das Merging von Kanälen erfolgten mit Hilfe der frei verfügbaren Software *ImageJ*.

2.16 Gewinnung von humanem Bronchialgewebe

Im Rahmen von operativen Eingriffen, die an der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie der Universitätsklinik des Saarlandes durchgeführt wurden, wurden bronchiale Gewebeproben zur immunhistochemischen Analyse entnommen. Das

Verfahren wurde durch die Ethikkommission der Landesärztekammer des Saarlandes genehmigt. Informed Consent der Patienten lag vor. Es wurden Proben von insgesamt neun Patienten gewonnen. Die Proben wurden unmittelbar nach Entnahme in Formalin fixiert.

2.17 Immunhistochemie

In Formalin fixierte humane Bronchialgewebeproben und Mauslungen wurden nach dem in Tabelle 10 aufgeführten Schema in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden mit einem Schlittenmikrotom in 2 mm dicke Scheiben geschnitten und nach dem Glätten im Wasser bei 40°C auf Objektträger aufgezogen.

Tabelle 10. Schema zur Einbettung von Gewebeproben in Paraffin

Schritt Nr.	Medium	Konzentration [%]	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	Wasser		RT	90
2	Ethanol	70	RT	60
3	Ethanol	80	RT	60
4	Ethanol	90	RT	60
5	Ethanol	100	RT	60
6	Ethanol	100	RT	60
7	Ethanol	100	RT	60
8	Xylol		RT	60
9	Xylol		RT	60
10	Xylol		45	60
11	Paraffin		60	60
12	Paraffin		60	60
13	Paraffin		60	60

Die Schnitte wurden zunächst 3 mal 5 Minuten in Xylen (Sigma-Aldrich) entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydratisiert (2 mal 5 Minuten in 100% Ethanol, 2 mal 5 Minuten in 95% Ethanol, 2 mal 5 Minuten in 70% Ethanol und 2 mal 5 Minuten in destilliertem Wasser). Anschließend erfolgte die Antigendemaskierung. Dazu wurden die Slides in 0,01 M Citratpuffer (pH 6,0) 3 mal 7 Minuten bei 400 Watt in der Mikrowelle hitzebehandelt. Die Ausschaltung der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgte mittels Inkubation der Schnitte in 3% H₂O₂ für 15 Minuten. Danach erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindestellen. Die Schnitte wurden hierzu nacheinander 15 Minuten mit *Protein Block Serum-Free* (Dako) und 30-60 Minuten mit 2-5% BSA in TBS-T inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper zur Detektion von FOXO3 (*Anti-FOXO3A antibody (ab47409)* (Abcam), Verdünnung 1:200 v/v) aufgetragen. Der

verwendete Primärantikörper ist kreuzreaktiv für humanes und murines FOXO3. Nach Inkubation über Nacht 4°C wurden die Schnitte 3 mal 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Für die folgenden Schritte wurde das Kit *EnVision + HRP. Rabbit (AEC+)* (Dako) verwendet. Die Schnitte wurden 30 Minuten mit dem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und erneut 3 mal gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte unter Überwachung der Farbreaktion für 5-30 Minuten mit der 3-Amino-9-Ethylcarbazol-Substratlösung inkubiert. Die Farbreaktion wurde rechtzeitig durch Eintauchen der Schnitte in TBS-T (pH 7,4) beendet. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Hämatoxylinlösung nach Mayer (Sigma-Aldrich). Abschließend wurden die Schnitte mit *Glycergel Mounting Medium* (Dako) eingedeckt. Zur Zusammensetzung der verwendeten Puffer siehe Tabelle 11.

Tabelle 11. Verwendete Puffer für die Immunhistochemie

10X Citratpuffer	Citric acid monohydrate H ₂ O dest.	21 g/l
20X TBS	NaCl 2,6 M Tris/HCL 0,4 M H ₂ O dest.	152 g/l 48,5 g/l
1X TBS-T	20x TBS pH 7.4 Tween-20 H ₂ O dest.	50 ml 2 ml 1 l

2.18 Statistische Analyse

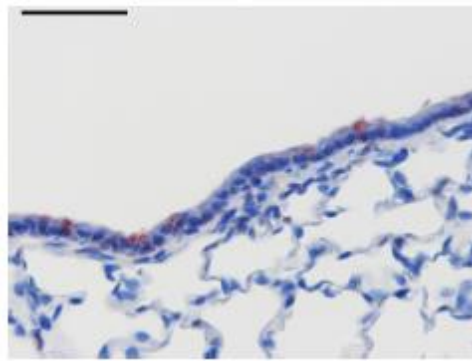
Die Werte sind gezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Der Vergleich von Gruppen erfolgte mittels zweiseitigem t-Test, bei mehr als zwei Gruppen pro Experiment mittels ANOVA mit Bonferroni-Anpassung. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $<0,05$ erachtet. Sämtliche Analysen erfolgten mit Hilfe der Software *Prism*.

3 Ergebnisse

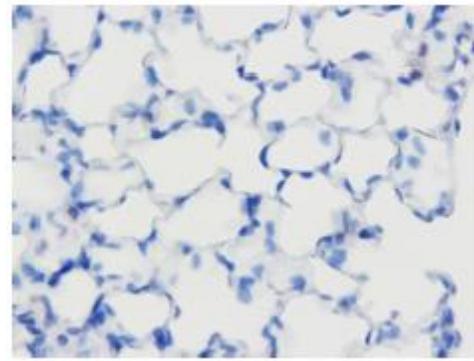
3.1 Bakterielle Infektion führt zur Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren in Atemwegsepithelzellen *in vivo*

Um zu untersuchen, ob bakterielle Infektion der Atemwege die Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren in Epithelzellen induziert, wurde ein etabliertes murines Pneumoniemodell [16] verwendet. Die Atemwege von Mäusen wurden entweder mit *P. aeruginosa* PAO1 oder Nontypeable *H. influenzae* (NTHi) infiziert. Drei Stunden nach Infektion wurden die Mäuse getötet. Die Lungen und unteren Atemwege wurden en-bloc explantiert und fixiert. Mit Hilfe immunhistochemischer Analyse der subzellulären FOXO3-Lokalisation in Gewebeschnitten wurde der Aktivierungszustand von FOXO3 bestimmt. Dabei wurde im Zellkern lokalisiertes FOXO3-Protein als transkriptionell aktiv betrachtet. Repräsentative Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 5 gezeigt.

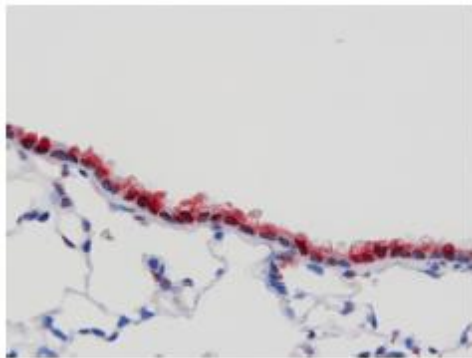
In den Zellkernen der Alveolar- und Bronchialepithelzellen nichtinfizierter Tiere war kein Signal für FOXO3 detektierbar. Dies weist darauf hin, dass FOXO in den Atemwegen gesunder Mäuse weitgehend inaktiviert ist. In den Lungen infizierter Tiere zeigte sich ein starkes nukleäres FOXO3-Signal in alveolären und bronchialen Atemwegsepithelzellen. Bakterielle Infektion resultiert somit in einer Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren in Atemwegsepithelzellen. Zusätzlich kam es in den Lungen infizierter Tiere zu einem Einstrom von Immunzellen myeloiden Ursprungs, wie für dieses Modell beschrieben [16]. Auch in diesen Zellen lag FOXO3 in nukleärer Lokalisation vor. Die zytoplasmatische FOXO3-Fraktion war insbesondere in bronchialen Atemwegsepithelzellen ebenfalls erhöht.



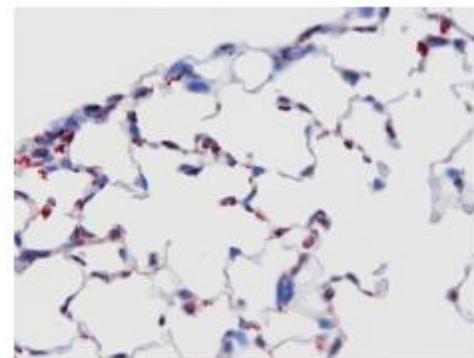
Kontrolle



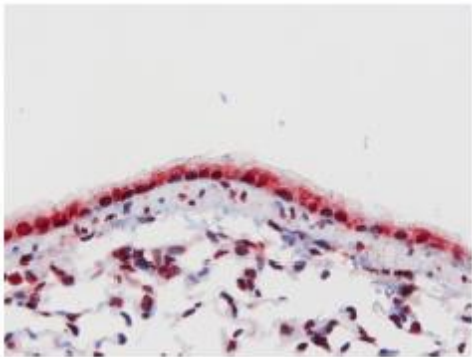
Kontrolle



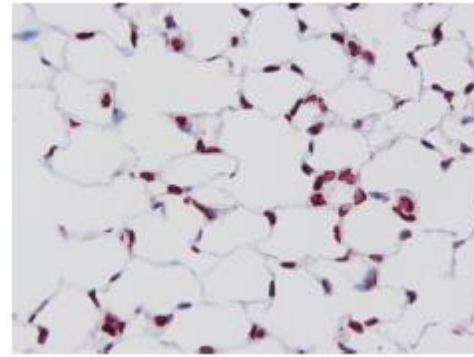
PAO1



PAO1



NTHi



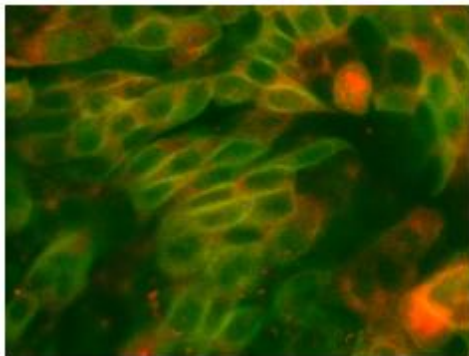
NTHi

Abbildung 5. Bakterielle Infektion führt zur Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren *in vivo*

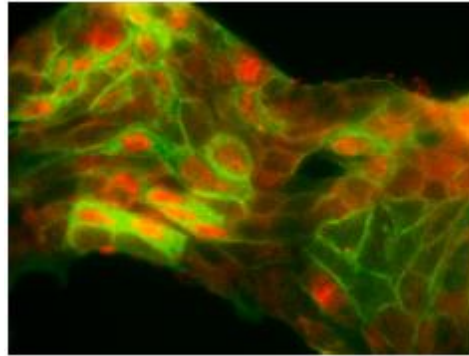
Mäuse wurden intranasal mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* PAO1 in PBS oder lebenden NTHi in PBS infiziert. Kontrolltiere wurden mit PBS ohne Bakterien behandelt. Nach 3 h wurden die Tiere getötet. Mittels Immunhistochemie wurde die subzelluläre Lokalisation von FOXO3 in den Atemwegen bestimmt. FOXO3 ist rot angefärbt. Der Skalierungsbalken zeigt eine Länge von 50 µm an.

3.2 Bakterielle Infektion führt zur Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren in Atemwegsepithelzellen *in vitro*

Nachdem im Tiermodell gezeigt werden konnte, dass bakterielle Infektion zur Aktivierung und nukleären Translokation von FOXO-Transkriptionsfaktoren führt, wurde untersucht, ob dies auch für bronchiale Epithelzellen in Zellkultur der Fall ist. Hierzu wurden Monolayer der bronchial-epithelialen Zelllinie Calu-3 für zwei Stunden mit lebenden NTHi infiziert. Als Zeichen der Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren wurde die subzelluläre Lokalisation von FOXO3 mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Wie in Abbildung 6 gezeigt, ist FOXO3 im Grundzustand weitgehend inaktiviert, erkennbar durch die fehlende nukleäre und schwache zytoplasmatische Färbung. Nach Infektion mit NTHi zeigte sich ein Anstieg des nukleären FOXO3-Signals. Hiervon betroffen waren jedoch nicht alle Kerne, vielmehr zeigte sich ein Muster fokaler FOXO-Aktivierung.



Kontrolle



NTHi

Abbildung 6. Bakterielle Infektion führt zur Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren *in vitro*

Calu-3-Zellen wurden auf Chamberslides kultiviert. Die Zellen wurden über Nacht ohne Serum inkubiert und anschließend für 1 h mit lebenden NTHi infiziert. Kontrollen wurden nicht infiziert. FOXO3 und Actin wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung visualisiert. FOXO3 ist im roten Kanal, Actin im grünen Kanal gezeigt.

3.3 Bakterielle Infektion hat keinen Einfluss auf die pulmonale FOXO3-Expression

Da FOXO3 im Verlauf bakterieller Infektionen in Atemwegsepithelzellen verstärkt nachgewiesen werden konnte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Genexpression von FOXO3 durch bakterielle Infektion erhöht wird. Dazu wurde mit Hilfe von qRT-PCR die relative Expression von FOXO3 in Lungenhomogenisaten mit *P. aeruginosa* PAO1 infizierter Mäuse und nicht infizierter Kontrollmäuse gemessen. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren. Die Zunahme des FOXO3-Signals nach bakterieller Infektion ist somit am ehesten nicht auf erhöhte Genexpression zurückzuführen.

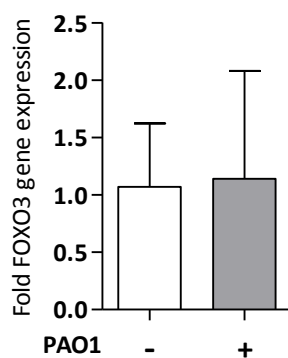


Abbildung 7. Bakterielle Infektion hat keinen Einfluss auf die pulmonale FOXO3-Expression

Mäuse wurden intranasal mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* PAO1 in PBS behandelt. Kontrolltiere wurden mit PBS ohne Bakterien behandelt. Nach 3 h wurden die Tiere getötet. Die Lungen wurden homogenisiert. Die relative Expression von mFoxo3 wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung, $n \geq 2$ pro Gruppe.

3.4 Nach Infektion nukleär translozierte FOXO-Transkriptionsfaktoren sind transkriptionell aktiv

Zur Beurteilung der transkriptionellen Aktivität von nukleärem FOXO-Protein nach bakterieller Infektion wurde ein Transkriptionsfaktorbindeassay durchgeführt. Hierzu wurden Monolayer von Calu-3-Zellen für 30 Minuten mit NTHi infiziert. Kontrollen wurden für die Dauer des Experiments mit Medium ohne NTHi inkubiert. Zur Charakterisierung nukleärer Proteine wurden Kernextrakte hergestellt. Äquivalente

Mengen an nukleärem Protein wurden mit Hilfe des kommerziell verfügbaren Kits *TransAM FKHR (FOXO1)* auf DNA-Bindeaktivität von FOXO1 untersucht. Bei dieser Methode wird FOXO1 an Oligonukleotide mit der FOXO-Konsensussequenz gebunden und anschließend durch Antikörper nachgewiesen. Das Verfahren macht sich den Umstand zunutze, dass nur aktiviertes FOXO1 an die DNA-Konsensussequenz bindet, während phosphoryliertes oder auf anderem Wege inaktiviertes FOXO1 keine DNA-Bindeaktivität aufweist und daher nicht detektiert wird. Wie in Abbildung 8 gezeigt, führte Infektion mit NTHi zu einer gesteigerten DNA-Bindeaktivität von FOXO1. Dies zeigt, dass FOXO-Transkriptionsfaktoren im Verlauf bakterieller Infektionen nicht nur in den Zellkern translozieren, sondern dort auch transkriptionell aktiv werden.

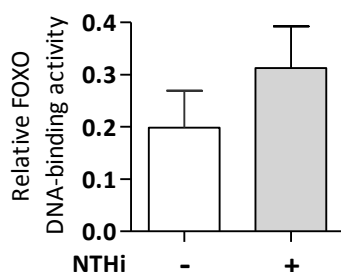


Abbildung 8. Nach Infektion nukleär translozierte FOXO-Transkriptionsfaktoren sind transkriptionell aktiv

Calu-3-Zellen wurden in 100mm-Petrischalen kultiviert. Die Zellen wurden über Nacht ohne Serum inkubiert und anschließend für 30 min mit lebenden NTHi infiziert. Kontrollen wurden nicht infiziert. Kernextrakte wurden präpariert. Die DNA-Bindeaktivität von FOXO1 in den Kernextrakten wurde mit Hilfe des TransAM FKHR kits bestimmt. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung. n=2 pro Gruppe.

3.5 Suppression der Expression von FOXO1 und FOXO3 in Calu-3-Zellen durch siRNA

Zur näheren Untersuchung der Funktion von FOXO-Transkriptionsfaktoren im Rahmen der angeborenen Immunität wurden mit Hilfe von siRNA FOXO1/3-defiziente Atemwegsepithelzellen generiert. Hierzu wurden Calu-3-Zellen mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA transfiziert. Als Kontrolle wurden Calu-3-Zellen mit unspezifischer scrambled sequence siRNA transfiziert, die zu keiner spezifischen Inhibition der Genexpression führt. Die Effektivität des FOXO1/3 silencing 24, 48 und 72

Stunden nach Transfektion wurde mit quantitativer real-time PCR evaluiert. Abbildung 9 zeigt, dass nach Transfektion mit spezifischer FOXO1/3-siRNA zu allen untersuchten Zeitpunkten die Expression von FOXO1 und FOXO3 reduziert ist. Somit wurde sichergestellt, dass die generierten Calu-3-Zellen zumindest bis 72 Stunden nach Transfektion tatsächlich FOXO1/3-defizient sind.

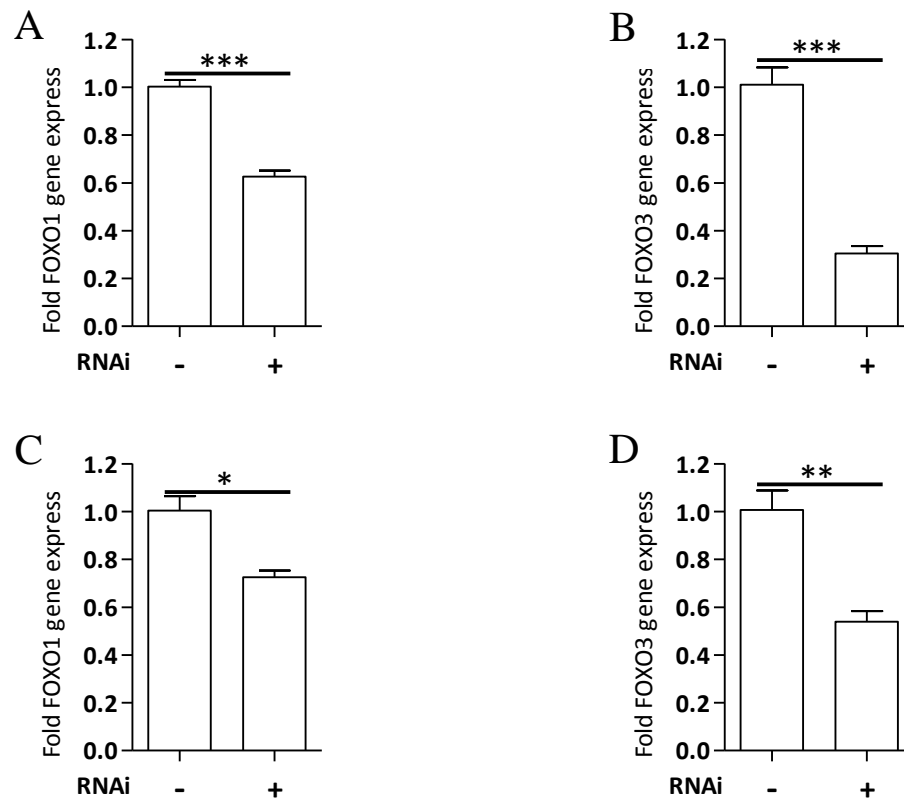


Abbildung 9. Suppression der Expression von FOXO1 und FOXO3 in Calu-3-Zellen durch siRNA

Calu-3-Zellen wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. Zur Evaluation der Effektivität des FOXO1/3-Silencing wurde 24 h (A, B) oder 72 h (C, D) nach Transfektion die relative Expression von FOXO1 (A, C) und FOXO3 (B, D) mittels qRT-PCR bestimmt. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung. A, B: n=6 pro Gruppe; C, D: n=3 pro Gruppe. * \triangleq $p < 0,05$, ** \triangleq $p < 0,01$, *** \triangleq $p < 0,001$. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

3.6 FOXO-Transkriptionsfaktoren regulieren Expression und Freisetzung von Faktoren der angeborenen Immunität in Atemwegsepithelzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass FOXO-Transkriptionsfaktoren im Verlauf bakterieller Infektionen des Atemwegsepithels aktiviert werden, wurde untersucht, welche Funktion aktiviertes FOXO-Protein in der Verarbeitung infektiöser Stimuli übernimmt. Die Identifikation FOXO-abhängiger Immunmechanismen erfolgte mit Hilfe FOXO1/3-defizienter Atemwegsepithelzellen. Zur Charakterisierung FOXO1/3-defizienter Atemwegsepithelzellen wurden Infektionsexperimente durchgeführt. Calu-3-Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion über Nacht in Medium ohne Serum und Antibiotika vorinkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Stimulation der Zellen mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* PAO1 oder lebenden NTHi für 4 Stunden bzw. mit antibiotikainaktivierten NTHi für 24 Stunden. Als Kontrollen dienten unstimulierte Zellen. Nach Abschluss der Versuche wurden die Zellkulturüberstände und Zelllysate gewonnen. Die Konzentration von IL-6, IL-8 und IP-10 in den Überständen wurde mittels ELISA bestimmt. Aus den Zelllysaten wurde RNA extrahiert und in cDNA transkribiert. Die relative Expression von IL-6, IL-8, IP-10 und hBD-2 wurde mittels qRT-PCR bestimmt.

In unstimulierten Zellen führte FOXO1/3-silencing zu einer signifikanten Abnahme der basalen Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 (-60%), IP-10 (-84%) und IL-8 (-55%), sowie der basalen Expression von hBD-2 (-73%) (Abbildung 10).

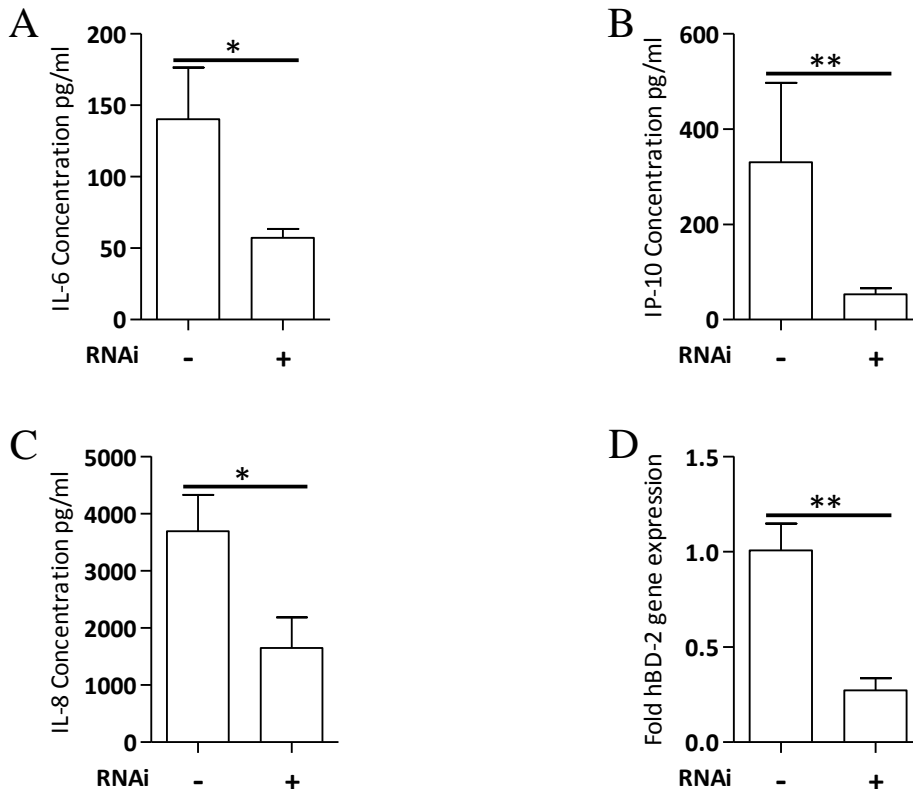


Abbildung 10. FOXO-Transkriptionsfaktoren regulieren die basale Expression und Freisetzung von Faktoren der angeborenen Immunität in Atemwegsepithelzellen

Calu-3 Zellen wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht in DMEM/F12 ohne Serum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium versetzt. Nach 4 h (A, B) bzw. 24 h (C, D) wurden die Zellkulturüberstände gewonnen und die Zellen lysiert. Die Konzentrationen von IL-6, IP-10 und IL-8 im Zellkulturüberstand wurden mittels ELISA bestimmt (A, B, C). Die relative Expression von hBD-2 wurde mittels qRT-PCR bestimmt (D). Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung. $n \geq 3$ pro Gruppe. * $\triangleq p < 0,05$, ** $\triangleq p < 0,01$. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Stimulation der Zellen mit Bakterien führte zu einer pathogen-spezifischen Antwort der Atemwegsepithelzellen (Abbildung 11). Die Stimulation mit lebenden NTHi für 4 Stunden führte zu einer Erhöhung der Freisetzung und Expression von IL-6. Die Erhöhung von IL-6 war in FOXO1/3-defizienten Zellen verglichen mit den Kontrollen jedoch supprimiert. Die Expression von hBD-2 und IP-10 wurde durch Stimulation mit lebenden NTHi für 4 Stunden nicht über das Basalniveau hinaus erhöht. Dennoch zeigte sich auch für diese Faktoren eine Herunterregulation in FOXO1/3-defizienten Zellen.

Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* für 4 Stunden resultierte ebenfalls in einer Hochregulation von IL-6 und zusätzlich von hBD-2 und IP-10. Im Gegensatz zur Stimulation mit lebenden NTHi wurde die Induktion von IL-6 durch FOXO1/3-silencing

nicht beeinflusst, während die *P. aeruginosa*-induzierte Hochregulation von hBD-2 und IP-10 in FOXO1/3-defizienten Zellen signifikant herunter reguliert war.

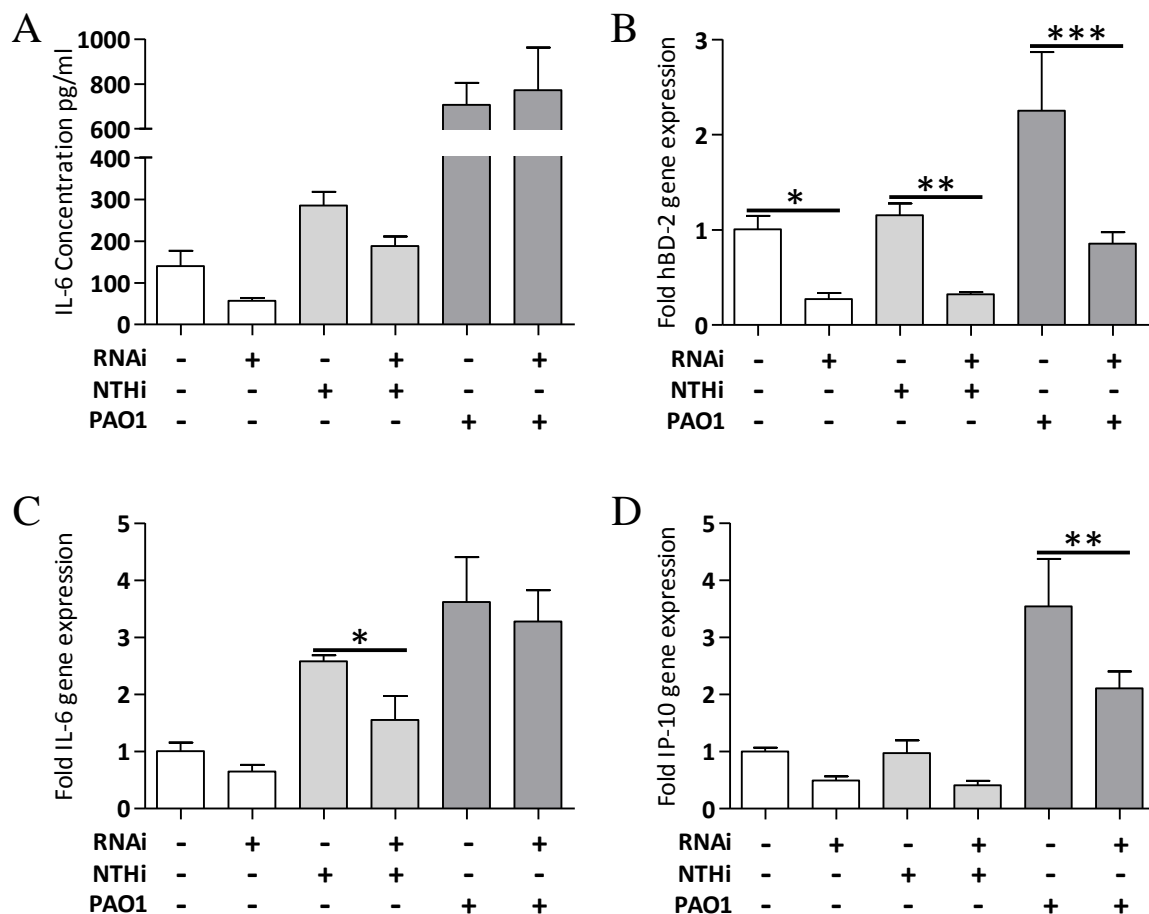


Abbildung 11. FOXO-Transkriptionsfaktoren regulieren Expression und Freisetzung von Faktoren der angeborenen Immunität in Atemwegsepithelzellen nach bakterieller Stimulation (I)

Calu-3 Zellen wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht in DMEM/F12 ohne Serum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 4 h mit lebenden NTHi, hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* PAO1 behandelt. Kontrollen wurden nur mit Medium behandelt. Die Konzentration von IL-6 im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt (A). Die relative Expression von hBD-2, IL-6 und IP-10 wurde mittels qRT-PCR bestimmt (B, C, D). Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung. n=3 pro Gruppe. * \triangleq $p < 0,05$, ** \triangleq $p < 0,01$, *** \triangleq $p < 0,001$. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Wie bereits erwähnt erwies sich die Stimulation mit lebenden NTHi für 4 Stunden als nicht suffizient für die Induktion der Expression von hBD-2 und IP-10. Daher wurde die Dauer der Stimulation auf 24 Stunden ausgeweitet (Abbildung 12). Um übermäßiges bakterielles Wachstum während des Versuchs zu limitieren, wurde das Wachstum von NTHi bereits vor der Addition zu den Zellen und zusätzlich über die gesamte

Versuchsdauer hinweg mit Hilfe von Antibiotika inhibiert. Die Stimulation der Zellen mit den inaktivierten NTHi für 24 Stunden führte zu einer erhöhten Expression bzw. Freisetzung von IL-6, hBD-2, IP-10 und IL-8. Im Vergleich zu mit control-siRNA behandelten Zellen war die Induktion aller genannten Faktoren in FOXO1/3-defizienten Zellen jedoch signifikant niedriger.

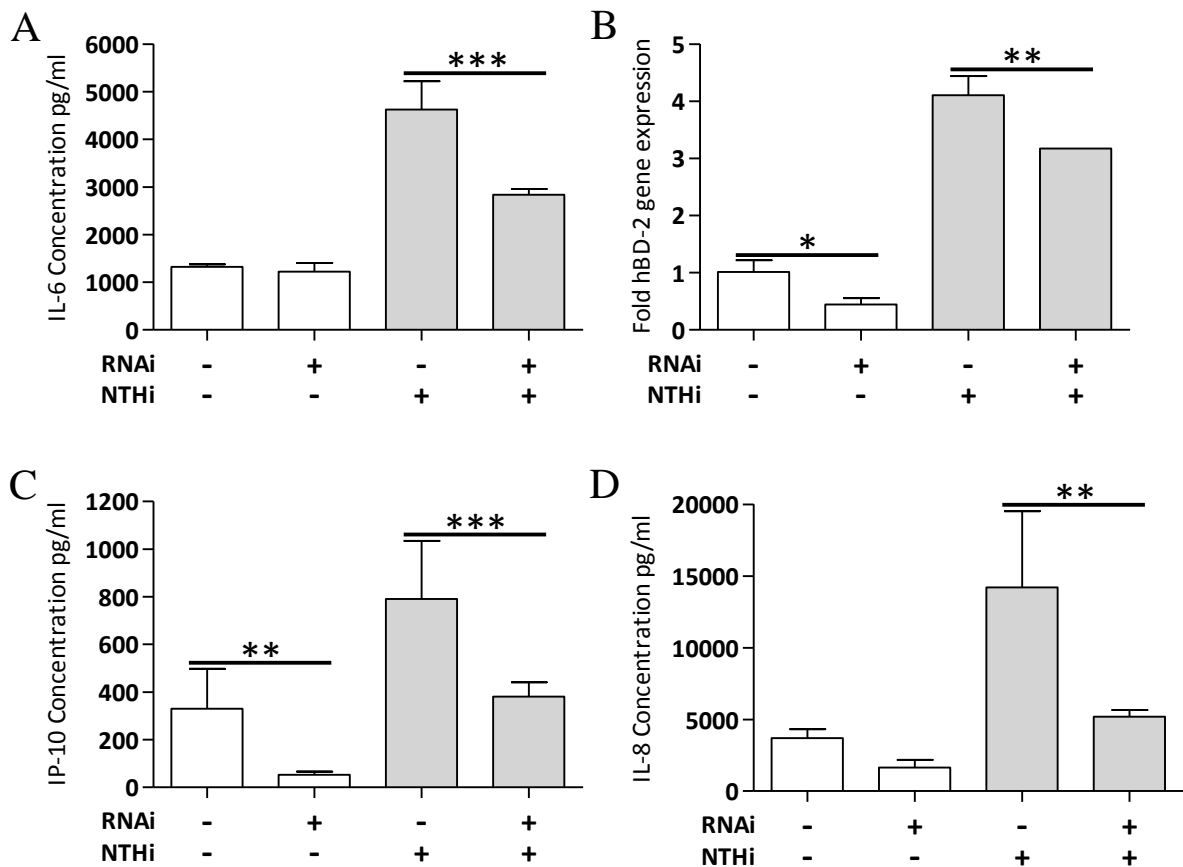


Abbildung 12. FOXO-Transkriptionsfaktoren regulieren Expression und Freisetzung von Faktoren der angeborenen Immunität in Atemwegsepithelzellen nach bakterieller Stimulation (II)

Calu-3 Zellen wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht in DMEM/F12 ohne Serum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Antibiotika-inaktivierten NTHi behandelt. Kontrollen wurden nur mit Medium behandelt. Die Konzentration von IL-6, IP-10 und IL-8 im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt (A, C, D). Die relative Expression von hBD-2 wurde mittels qRT-PCR bestimmt (B). Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung. n=3 pro Gruppe. * \triangleq $p < 0,05$, ** \triangleq $p < 0,01$. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Zusammengefasst resultierte FOXO1/3-silencing in einer reduzierten Expression und Freisetzung von Faktoren der angeborenen Immunität sowohl unter Basalbedingungen als auch nach bakterieller Stimulation.

3.7 FOXO-Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Internalisierung von NTHi in Atemwegsepithelzellen

In einer Studie von Morey et al. wurde gezeigt, dass NTHi durch Alveolarepithelzellen der Zelllinie A549 internalisiert werden [129]. Die Internalisierung erfolgte PI3K-abhängig. Da FOXO-Transkriptionsfaktoren als wichtige Zielstruktur des PI3K-Signalwegs beschrieben sind, wurde der Zusammenhang von FOXO und der Internalisierung von NTHi in Atemwegsepithelzellen genauer untersucht.

Hierzu wurden zunächst Monolayer von Calu-3-Zellen mit lebenden NTHi infiziert. Um den Einfluss der PI3K zu untersuchen, wurde ein Teil der Wells für die Dauer der Infektion zusätzlich mit LY294002, einem spezifischen Inhibitor der PI3K, behandelt. Nach 2 Stunden Infektionszeit wurden extrazellulär verbliebene Bakterien mit Hilfe von Gentamicin getötet und intrazelluläre Bakterien in den Zelllysaten detektiert. Wie bereits in A549-Zellen gezeigt, enthielten die Lysate von Zellen, bei denen die PI3K während der Infektion gehemmt worden war, signifikant geringere Mengen an NTHi. Dies ist vereinbar mit der Hypothese, dass die Zahl intrazellulär lokalisierter Bakterien durch Aktivierung von FOXO reduziert wird.

Um dies näher zu überprüfen, wurde der NTHi-Internalisierungsversuch mit FOXO1/3-defizienten Zellen bzw. control-siRNA-behandelten Zellen durchgeführt. Hierbei war die Anzahl intrazellulär nachweisbarer NTHi in FOXO1/3-defizienten Zellen signifikant erhöht. Da zuvor bereits gezeigt wurde, dass FOXO-Transkriptionsfaktoren bei Infektion mit NTHi aktiviert werden, weist dies darauf hin, dass aktives FOXO1 und FOXO3 protektiv gegen die Invasion bzw. intrazelluläre Persistenz von Pathogenen wirksam sind.

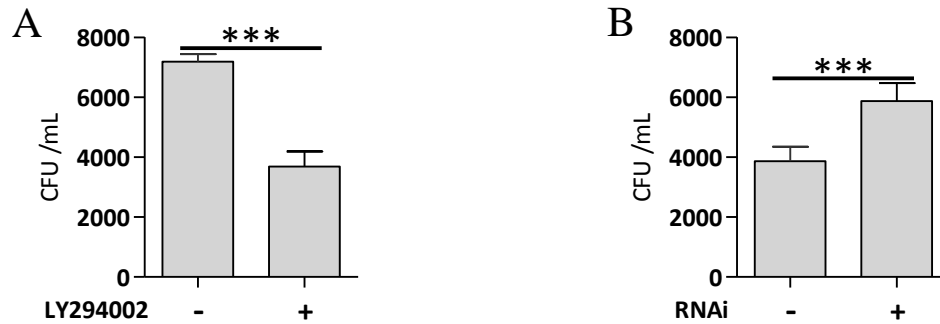


Abbildung 13. FOXO-Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Internalisierung von NTHi in Atemwegsepithelzellen

(A) Calu-3-Monolayer wurden über Nacht ohne Serum inkubiert und anschließend in An- oder Abwesenheit des PI3K-Inhibitors LY294002 (Molarität 50 μ M) für 2 h mit lebenden NTHi infiziert. Die intrazellulären NTHi-Titer wurden mit Hilfe des NTHi-Internalisierungsassays quantifiziert wie im Methodenteil beschrieben. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung. $n=3$ pro Gruppe. *** $\triangleq p < 0,001$. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. (B) Calu-3 Zellen wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht ohne Serum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 h mit lebenden NTHi infiziert. Die intrazellulären NTHi-Titer wurden mit Hilfe des NTHi-Internalisierungsassays quantifiziert wie im Methodenteil beschrieben. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung. $n=6$ pro Gruppe. *** $\triangleq p < 0,001$.

3.8 Validierung des NTHi-Internalisierungsassays

Zur Evaluation der Aussagekraft des NTHi-Internalisierungsassays wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Hierbei sollte einerseits geprüft werden, wie effektiv das Abtöten extrazellulärer Bakterien durch Gentamicin ist, andererseits, welchen Stellenwert die Lysierung der Zellen mit Saponin zur Freisetzung intrazellulär lokalisierter Bakterien hat. Die Versuchsbedingungen entsprachen dem in Kapitel 2.13 beschriebenen Standardprotokoll des NTHi-Internalisierungsassays. In Abweichung vom Standardprotokoll wurde ein Teil der Wells als Kontrollgruppe nicht mit Gentamicin behandelt. Zusätzlich wurde in beiden Gruppen am Ende des Experiments die Hälfte der Wells nicht zur Lysierung mit Saponin behandelt, sondern lediglich mit PBS versetzt. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 14 dargestellt.

Wie erwartet waren die zu detektierenden NTHi-Titer sehr hoch, wenn die Zellen nach der Infektion nicht mit Gentamicin behandelt wurden, was am ehesten auf den Nachweis durch die Waschschriffe nicht entfernter extrazellulärer Bakterien zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu waren nahezu keine Bakterien nachweisbar, wenn extrazelluläre Bakterien wie im Standardprotokoll mit Gentamicin abgetötet worden waren und keine

Freisetzung intrazellulärer Bakterien durch Lysierung der Zellen mit Saponin erfolgte. Wurden Zellen mit Saponin lysiert, waren in beiden Gruppen deutlich erhöhte Zahlen an NTHi nachweisbar. Die Titer der Gruppe, die im Verlauf sowohl mit Gentamicin, als auch mit Saponin behandelt wurde (was dem Standardprotokoll entspricht) waren mit den zuvor im NTHi-Internalisierungsassay ermittelten Werten vergleichbar (vgl. Abbildung 13).

Zusammengefasst wurde in diesem Kontrollexperiment gezeigt, dass das Abtöten extrazellulärer Bakterien durch Gentamicin im Rahmen des NTHi-Internalisierungsassays effektiv ist, und dass die detektierten Bakterien tatsächlich aus dem Zellinneren stammen.

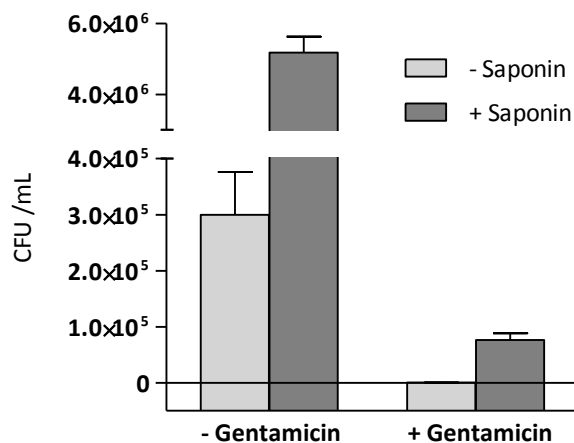


Abbildung 14. Validierung des NTHi-Internalisierungsassays

HBEC wurden in Standardmedium ohne Antibiotika kultiviert. Der NTHi-Internalisierungsassay wurde durchgeführt. Hierfür wurden Monolayer für 2 h mit lebenden NTHi infiziert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden das NTHi-haltige Medium entfernt und die Zellen dreimal mit warmem PBS gewaschen. Anschließend wurde eine Hälfte der Wells mit Medium ohne Gentamicin behandelt (Gruppe „- Gentamicin“), die andere Hälfte erhielt Medium mit Gentamicin in einer Konzentration von 50 µg/ml (Gruppe „+ Gentamicin“). Die Zellen wurden für 1 Stunde inkubiert und danach erneut dreimal mit warmem PBS gewaschen. Anschließend wurde jeweils die Hälfte der Wells der beiden Gruppen mit PBS ohne Saponin behandelt (- Saponin), die andere Hälfte erhielt 1% Saponin in PBS. Die dabei entstandenen Lösungen wurden zur Bestimmung des NTHi-Titers in geeigneten Verdünnungen auf Chocolate-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert ± Standardabweichung. n=3 pro Gruppe.

3.9 FOXO1/3-silencing hat keinen Einfluss auf die TLR5-vermittelte angeborene Immunantwort von Atemwegsepithelzellen

Um den zugrunde liegenden Mechanismus der FOXO-abhängigen Regulation der angeborenen Immunität zu identifizieren wurden Studien mit verschiedenen TLR-Agonisten durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, wie FOXO1/3-silencing die Induktion der angeborenen Immunantwort in Atemwegsepithelzellen beeinflusst. Die TLR-Agonisten LPS (TLR4-Agonist) und PAM3CSK4 (TLR1/2-Agonist) führten zu keiner signifikanten Induktion der Freisetzung von IL-6 in Calu-3-Zellen und wurden daher als nicht geeignet für weitere Experimente erachtet. Im Gegensatz dazu führte Behandlung der Zellen mit dem TLR5-Agonisten Flagellin in einer Konzentration von 1 µg/ml für 24 Stunden zu einer signifikanten Hochregulation von IL-6. Die Induktion von IL-6 war in FOXO1/3-defizienten Zellen ebenso stark vorhanden wie in control-siRNA-behandelten Zellen, übereinstimmend mit den Ergebnissen des Versuch mit dem Flagellin-exprimierenden *P. aeruginosa*-Stamm PAO1. Die TLR5-vermittelte angeborene Immunantwort ist somit am ehesten FOXO-unabhängig.

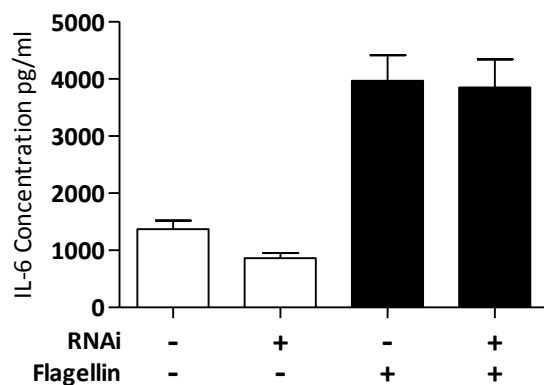


Abbildung 15. FOXO1/3-silencing hat keinen Einfluss auf die TLR5-vermittelte angeborene Immunantwort von Atemwegsepithelzellen

Calu-3 Zellen wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht in DMEM/F12 ohne Serum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Flagellin [1 µg/ml] stimuliert. Die Konzentration von IL-6 im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert ± Standardabweichung. n=4 pro Gruppe. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

3.10 FOXO1/3-silencing hat keinen Einfluss auf die IL-1 β -vermittelte angeborene Immunantwort von Atemwegsepithelzellen

Angeborene Immunmechanismen von Atemwegsepithelzellen werden nicht nur über Pattern-recognition-Rezeptoren wie Toll-like-Rezeptoren vermittelt, sondern auch durch Zytokine, die von aktivierten Immunzellen, beispielsweise Alveolarmakrophagen, produziert werden. Um zu untersuchen, ob die zytokingetriggerte Immunreaktion durch FOXO-Transkriptionsfaktoren moduliert wird, wurden FOXO1/3-defiziente Atemwegsepithelzellen für 24 Stunden mit IL-1 β in einer Konzentration von 1 ng/ml stimuliert. IL-1 β wird bei bakterieller Infektion u.a. von Makrophagen freigesetzt und ist ein potenter Aktivator der angeborenen Immunantwort. Wie in Abbildung 16 gezeigt, hatte Silencing von FOXO1 und FOXO3 keinerlei inhibierenden Einfluss auf die Freisetzung von IL-6 durch Atemwegsepithelzellen nach Stimulation mit IL-1 β . Vielmehr war die Abgabe von IL-6 in FOXO-defizienten Zellen sogar leicht erhöht. Die IL-1 β -vermittelte angeborene Immunantwort ist somit am ehesten FOXO-unabhängig.

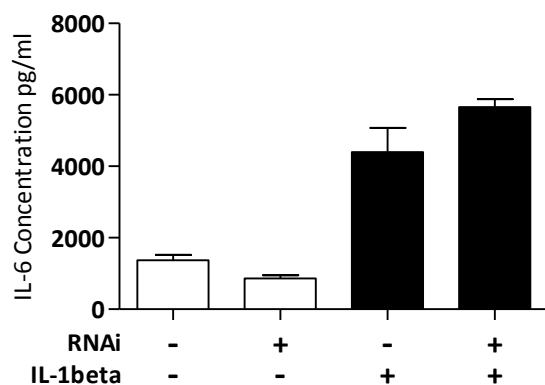


Abbildung 16. FOXO1/3-silencing hat keinen Einfluss auf die IL-1 β -vermittelte angeborene Immunantwort von Atemwegsepithelzellen

Calu-3-Zellen wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht in DMEM/F12 ohne Serum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit IL-1 β [1 ng/ml] stimuliert. Die Konzentration von IL-6 im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung. n=4 pro Gruppe. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

3.11 FOXO-Transkriptionsfaktoren sind essenziell für die TLR3-vermittelte angeborene Immunantwort von Atemwegsepithelzellen

Um zu untersuchen, ob FOXO-Transkriptionsfaktoren an der Vermittlung endosomaler TLR-Signaltransduktion beteiligt sind, wurden Studien mit Poly-(I:C), einem spezifischen synthetischen TLR3-Agonisten [4,120], an FOXO1/3-defizienten Atemwegsepithelzellen durchgeführt.

Nach Stimulation mit Poly-(I:C) in einer Konzentration von 1 µg/ml für 24 Stunden kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Freisetzung von IL-6 und IP-10 in control-siRNA-behandelten Zellen, nicht jedoch in FOXO1/3-defizienten Zellen. Bei diesen war die Freisetzung von IL-6 und IP-10 nach Poly-(I:C)-Stimulation bis auf das Basalniveau supprimiert. Die IL-6- und IP-10-Daten auf Proteinebene wurden durch entsprechende Ergebnisse auf mRNA-Ebene verifiziert.

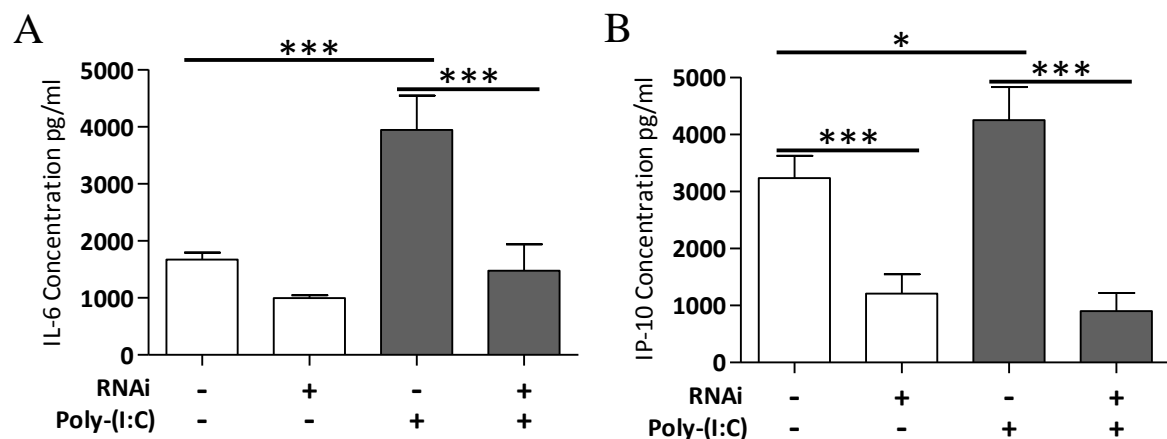


Abbildung 17. FOXO-Transkriptionsfaktoren sind essenziell für die TLR3-vermittelte angeborene Immunantwort von Atemwegsepithelzellen (I)

Calu-3-Zellen wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht ohne Serum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Poly-(I:C) [1 µg/ml] stimuliert. Die Konzentrationen von IL-6 (A) und IP-10 (B) im Zellkulturüberstand wurden mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung. n=3 pro Gruppe. * \triangleq p < 0,05, *** \triangleq p < 0,001. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Die Poly-(I:C)-vermittelte Induktion von IL-8 war in FOXO1/3-defizienten Zellen ebenfalls vermindert, jedoch in geringerem Ausmaß als bei IL-6 und IP-10.

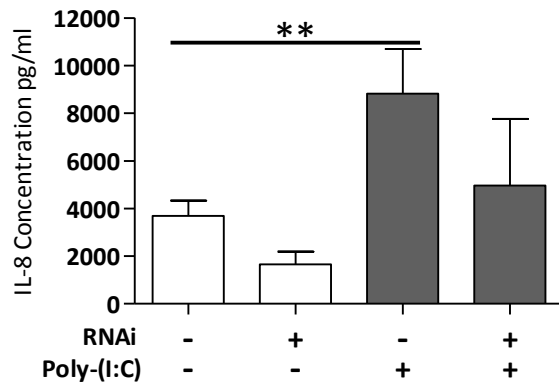


Abbildung 18. FOXO-Transkriptionsfaktoren sind essenziell für die TLR3-vermittelte angeborene Immunantwort von Atemwegsepithelzellen (II)

Calu-3-Zellen wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht ohne Serum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Poly-(I:C) [1 µg/ml] stimuliert. Die Konzentration von IL-8 im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert ± Standardabweichung. n=3 pro Gruppe. ** \triangleq $p < 0,01$.

Analoge Ergebnisse wurden mittels qRT-PCR für hBD-2 und TNF generiert. Die relative Expression von hBD-2 und TNF nach Poly-(I:C)-Stimulation war in FOXO1/3-defizienten Zellen jeweils signifikant niedriger als in control-siRNA-behandelten Zellen.

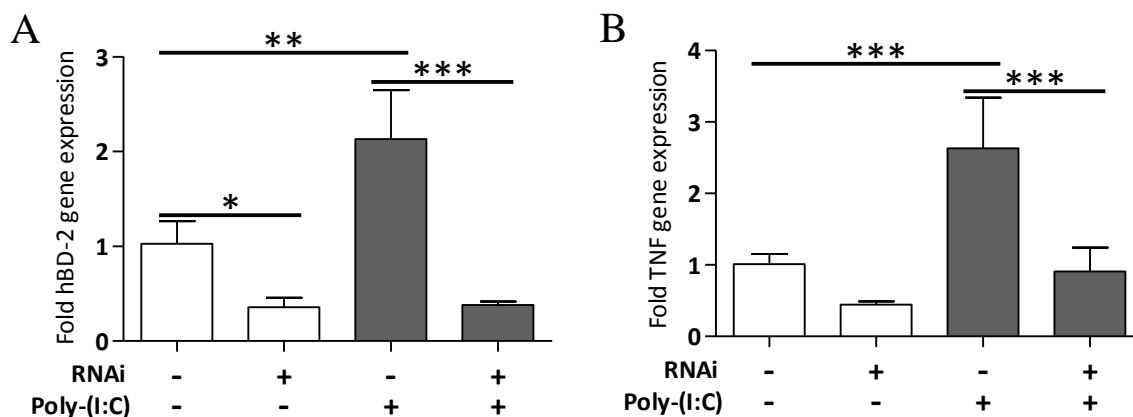


Abbildung 19. FOXO-Transkriptionsfaktoren sind essenziell für die TLR3-vermittelte angeborene Immunantwort von Atemwegsepithelzellen (III)

Calu-3-Zellen wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht ohne Serum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Poly-(I:C) [1 µg/ml] stimuliert. Die relative Expression von hBD-2 (A) und TNF (B) wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert ± Standardabweichung. n=3 pro Gruppe. * \triangleq $p < 0,05$, ** \triangleq $p < 0,01$, *** \triangleq $p < 0,001$.

Eine ungehinderte Expression von FOXO1 und FOXO3 scheint somit Grundvoraussetzung für die Induktion der TLR3-vermittelter angeborenen Immunantwort zu sein.

Nebenbefundlich waren, wie z.T. bereits in den zuvor gezeigten Experimenten, die Basalraten der Freisetzung bzw. Expression der untersuchten Faktoren IL-6, IP-10, IL-8, hBD-2 und TNF in unstimulierten FOXO1/3-defizienten Zellen deutlich verringert.

3.12 FOXO1/3-silencing hat keinen Einfluss auf die Expression von TLR3 in Atemwegsepithelzellen

Eine naheliegende Begründung für die Abhängigkeit TLR3-vermittelter Immunmechanismen von der Integrität der Expression von FOXO-Transkriptionsfaktoren wäre die Herunterregulation der Expression von TLR3 im Rahmen des FOXO1/3-silencing. Daher wurde die relative Expression von TLR in FOXO1/3-defizienten Atemwegsepithelzellen mittels qRT-PCR quantifiziert. Hierbei zeigte sich kein relevanter Unterschied in der TLR3-Expression zwischen FOXO1/3-defizienten und control-siRNA-behandelten Zellen.

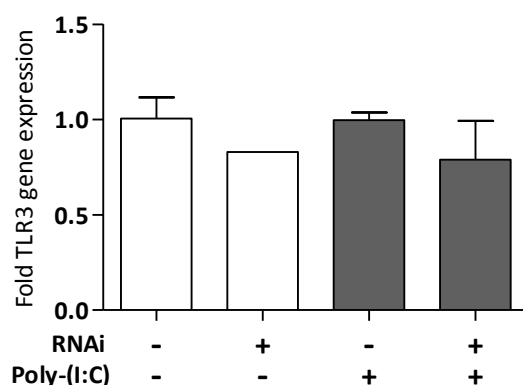


Abbildung 20. FOXO1/3-silencing hat keinen Einfluss auf die Expression von TLR3 in Atemwegsepithelzellen

Calu-3-Zellen wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht ohne Serum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Poly-(I:C) [1 µg/ml] stimuliert. Die relative Expression von TLR3 wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert ± Standardabweichung. n=3 pro Gruppe.

3.13 Stimulation von Atemwegsepithelzellen mit Poly-(I:C) in einer Konzentration von 1 µg/ml führt nicht zum Zelltod

In einer Studie von Numata et al. wurde gezeigt, dass Stimulation mit Poly-(I:C) in einer Konzentration von 10 µg/ml TLR3-vermittelt die Apoptose von Atemwegsepithelzellen induziert [139]. Daher wurde untersucht, ob unter der in dieser Arbeit verwendeten Poly-(I:C)-Konzentration von 1 µg/ml Phänomene des Zelltods beobachtet werden können. Zur Bestimmung der Zytotoxizität der gewählten Versuchsbedingungen wurde ein LDH-Zytotoxizitätsassay durchgeführt (Abbildung 21). Weder konnte hierbei unter einer der gewählten Versuchsbedingungen eine relevante Zytotoxizität von >5% festgestellt werden, noch zeigten sich relevante Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen. Damit wurde gezeigt, dass die siRNA-Transfektion an sich, das FOXO1/3-silencing und der Entzug von Insulin sowohl alleine als auch in Kombination mit TLR3-Stimulation keine relevante Zellschädigung verursachten.

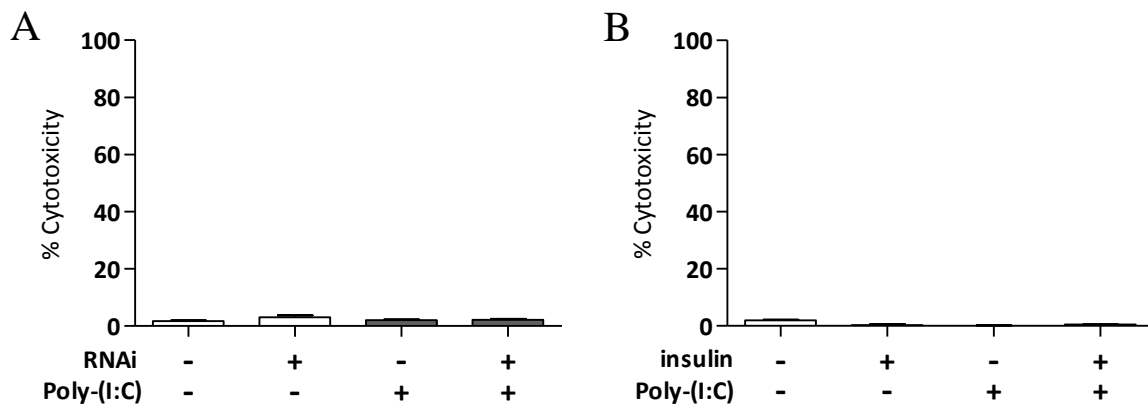


Abbildung 21. siRNA-Transfektion, Insulinentzug und Poly-(I:C)-Stimulation haben keinen zytotoxischen Effekt auf Atemwegsepithelzellen

(A) Calu-3-Zellen wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht ohne Serum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Poly-(I:C) [1 µg/ml] stimuliert. Kontrollen wurden nicht stimuliert.

(B) HBEC wurden über Nacht in Medium ohne Insulin inkubiert und danach für 30 min mit Insulin [5 µg/ml] vorinkubiert. Kontrollen erhielten kein Insulin. Anschließend wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von Insulin für 24 h mit Poly-(I:C) [1 µg/ml] stimuliert. Kontrollen wurden nicht stimuliert. Die Messung der Zytotoxizität erfolgte mit Hilfe des LDH-Zytotoxizitätsassays wie im Methodenteil beschrieben. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung. n=2 pro Gruppe.

Darüber hinaus wurde die Expression des Gens Bim untersucht. Bim ist als FOXO-Zielgen gut beschrieben und wird im Rahmen der FOXO-vermittelten Apoptose verstärkt exprimiert [38]. Hiermit sollte überprüft werden, ob durch etwaige Aktivierung von FOXO durch Poly-(I:C) ein proapoptotisches transkriptionelles Programm verursacht wird. Da die Expression von Bim unter sämtlichen Bedingungen auf basalem Niveau konstant ist, ist hiervon nicht auszugehen.

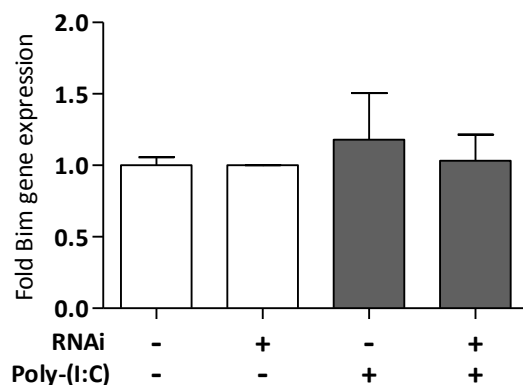


Abbildung 22. Die Expression des proapoptotischen Gens Bim wird durch Poly-(I:C) nicht beeinflusst

Calu-3-Zellen wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht ohne Serum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Poly-(I:C) [1 µg/ml] stimuliert. Die relative Expression von Bim wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert ± Standardabweichung. n=3 pro Gruppe.

3.14 Suppression der Expression von FOXO1 und FOXO3 in primären humanen Bronchialepithelzellen durch siRNA

Um die mit Calu-3-Zellen akquirierten Daten in primären humanen Bronchialepithelzellen (HBEC) zu verifizieren und weiterführende Experimente mit Insulin zu ermöglichen wurden mit Hilfe von siRNA FOXO1/3-defiziente HBEC generiert. Hierzu wurden HBEC mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA transfiziert wie in Kapitel 2.6 beschrieben. Als Kontrolle wurden HBEC mit unspezifischer scrambled sequence siRNA (control-siRNA) transfiziert, die zu keiner spezifischen Inhibition der Genexpression führt. Die Effektivität des FOXO1/3-silencing 24 Stunden nach Transfektion wurde mittels qRT-PCR evaluiert. Abbildung 23 zeigt, dass nach Transfektion mit spezifischer FOXO1/3-siRNA die Expression von FOXO1 und FOXO3 signifikant reduziert war.

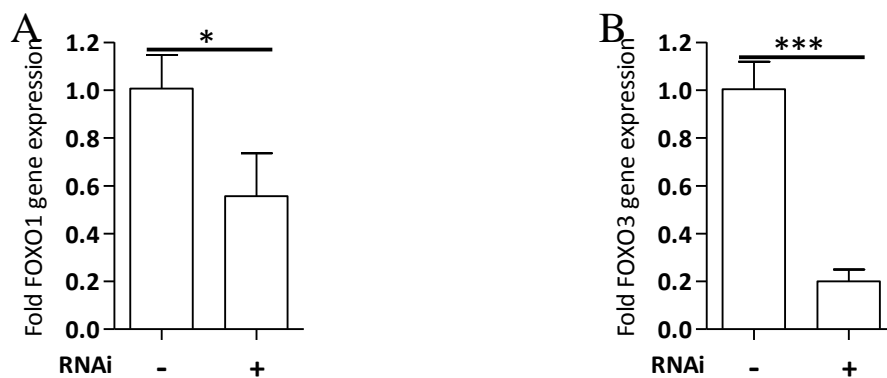


Abbildung 23. Suppression der Expression von FOXO1 und FOXO3 in HBEC durch siRNA

HBEC wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. Zur Evaluation der Effektivität des FOXO1/3-Silencing wurde 24 h nach Transfektion die relative Expression von FOXO1 (A) und FOXO3 (B) mittels qRT-PCR bestimmt. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung. $n=6$ pro Gruppe. * $\triangleq p < 0,05$, *** $\triangleq p < 0,001$. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

3.15 Einfluss von Insulin auf die FOXO-vermittelte angeborene Immunantwort in primären humanen Bronchialepithelzellen

Da Insulin über Aktivierung des PI3K-Signalwegs inhibierenden Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von FOXO-Transkriptionsfaktoren hat, wurde untersucht, ob Insulin die angeborene Immunantwort von Atemwegsepithelzellen beeinflusst. Aufgrund der Tatsache, dass insulinvermittelte Signalprozesse in Krebszellen häufig alteriert sind [20,150], wurden originäre Krebszelllinien für Versuche mit Insulin als ungeeignet erachtet. Daher wurden an Stelle von Calu-3-Zellen HBEC verwendet. Diese werden in einem definierten Medium kultiviert, das als Basalmedium mit separatem Supplement-Kit geliefert wird. Bestandteil des Supplement-Kits ist u.a. Insulin, so dass dieses je nach Bedarf in beliebigen Konzentrationen zum Basalmedium zugesetzt werden kann oder nicht.

Durch die Verwendung von HBEC sollte zudem überprüft werden, ob sich die mit der Zelllinie Calu-3 generierten Daten zum FOXO1/3-silencing in Primärzellen von humanen Spendern replizieren lassen.

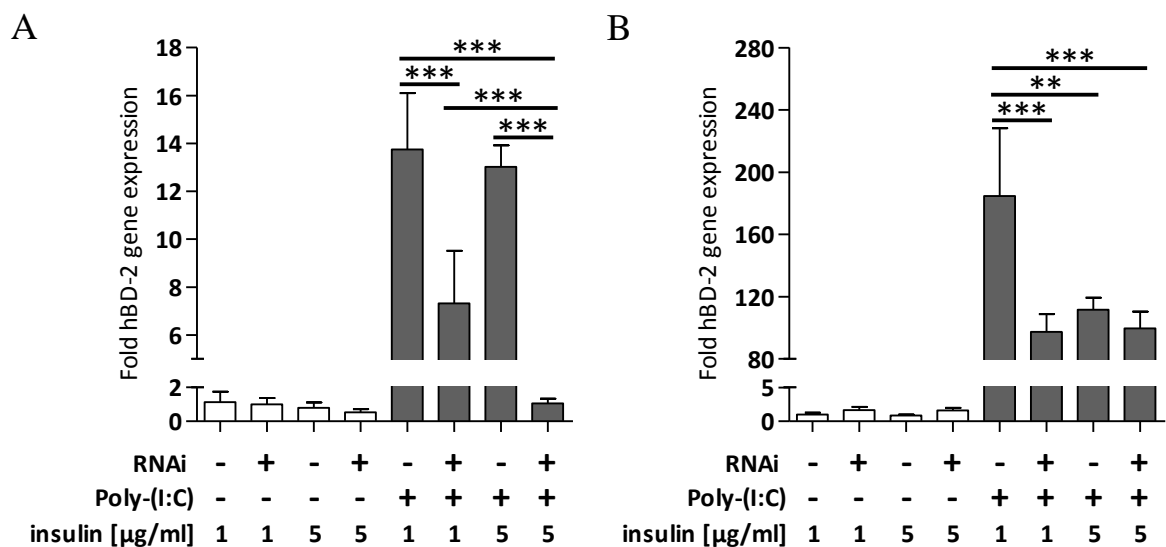
Hierzu wurden mit Hilfe von siRNA FOXO1/3-defiziente HBEC generiert. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit entweder 1 $\mu\text{g/ml}$ oder 5 $\mu\text{g/ml}$ Insulin inkubiert, wobei

letzteres die vom Hersteller des Mediums vorgesehene Standardkonzentration darstellt. Anschließend wurde bei wie zuvor weiterbestehenden Insulinkonzentration für 24 Stunden mit Poly-(I:C) bei einer Konzentration von 1 µg/ml stimuliert. Nach Abschluss des Versuchs wurden die Konzentrationen von IL-6 und IP-10 im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. Die Expression von hBD-2 wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Der Versuch wurde zweimal mit Zellen von jeweils einem Spender pro Versuch durchgeführt. In

Abbildung 24 sind die Ergebnisse dieser Versuche gezeigt. Mit Ausnahme von IL-6 lieferten die Analysen der Zellen beider Spender qualitativ vergleichbare Ergebnisse. Verglichen wurden insbesondere die Bedingungen maximaler FOXO-Aktivierung (niedriges Insulin + control-siRNA) und maximaler FOXO-Inhibition (hohes Insulin + FOXO1/3-siRNA) bei Stimulation mit Poly-(I:C). Die Expression bzw. Freisetzung von hBD-2 und IP-10 nach Stimulation mit Poly-(I:C) war in Zellen, in denen die Aktivität von FOXO mit Hilfe von Insulin und siRNA blockiert wurde, gegenüber Zellen, in denen FOXO durch Insulinentzug aktiviert wurde, deutlich reduziert. Gleiches zeigte sich bei Spender 1 für IL-6. Bei Spender 2 war die IL-6-Freisetzung unter der hohen Insulinkonzentration tendenziell höher.

Ein immunsuppressiver Effekt von Insulin alleine ließ sich (wiederum mit Ausnahme von IL-6) nur bei Spender 2, nicht bei Spender 1 beobachten.

Die ausführliche Beschreibung der Ergebnisse erfolgt aus Gründen der Übersichtlichkeit zusammen mit deren Diskussion in Kapitel 4.5.



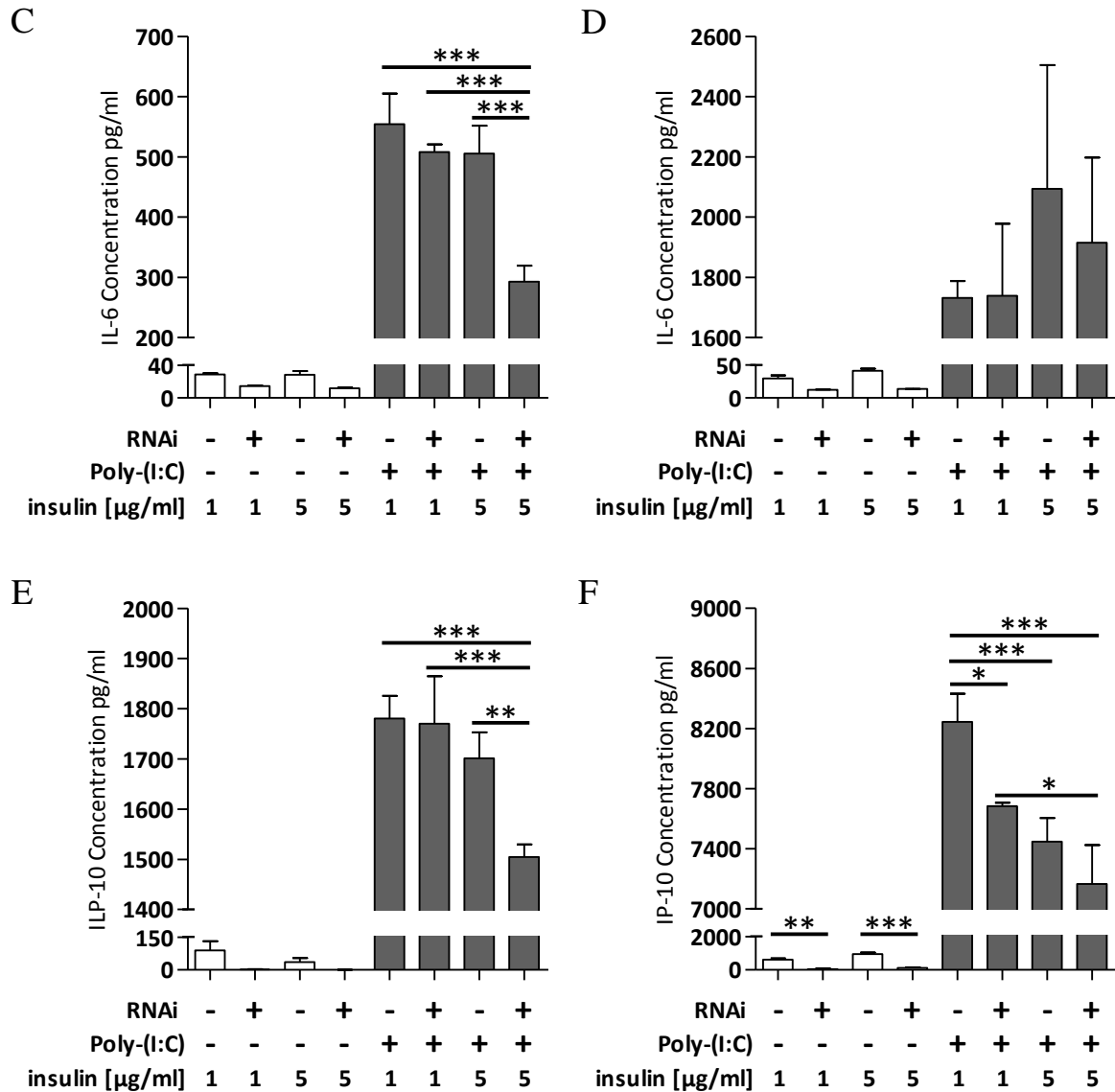


Abbildung 24. Einfluss von Insulin auf die FOXO-vermittelte angeborene Immunantwort in HBEC

HBEC zweier verschiedener Spender wurden mit unspezifischer control-siRNA (RNAi -) oder mit spezifischer siRNA gegen FOXO1- und FOXO3-mRNA (RNAi +) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Medien gewechselt: die Zellen wurden mit Medium mit Insulin in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ oder 5 $\mu\text{g/ml}$ versetzt. Nach 24 h wurde das Medium abermals gewechselt: Die Zellen wurden für weitere 24 h mit Poly-(I:C) in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert. Kontrollen blieben unstimuliert. Die Insulinkonzentrationen wurden jeweils beibehalten. 72 h nach Transfektion wurde der Versuch beendet. Die relative Expression von hBD-2 wurde mittels qRT-PCR bestimmt (A, B). Die Konzentrationen von IL-6 (C, D) und IP-10 (E, F) im Zellkulturüberstand wurden mittels ELISA bestimmt. A, C, E zeigen Ergebnisse aus Zellen von Spender 1, B, D, F zeigen Ergebnisse aus Zellen von Spender 2. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung. n=3 pro Gruppe. * \triangleq p < 0,05, ** \triangleq p < 0,01, *** \triangleq p < 0,001.

3.16 Einfluss von Insulin auf die Internalisierung von NTHi in primären bronchialen Atemwegsepithelzellen

Mit Hilfe des NTHi-Internalisierungsassays wurde untersucht, welchen Einfluss PI3K-Inhibition bzw. Insulin auf die Internalisierung von Bakterien in HBEC haben. Die in Calu-3-Zellen beobachtete Senkung der Keimzahl bei PI3K-Inhibition konnte im Primärzellversuch bestätigt werden. Zusätzlich zeigte sich eine Abhängigkeit der Zahl intrazellulär lokalisierter NTHi von Insulin. Dabei waren unter Bedingungen maximaler FOXO-Inhibition (Behandlung mit Insulin) ca. viermal so viele Bakterien nachweisbar wie unter Bedingungen maximaler FOXO-Aktivierung (Insulindepletion + PI3K-Inhibition).

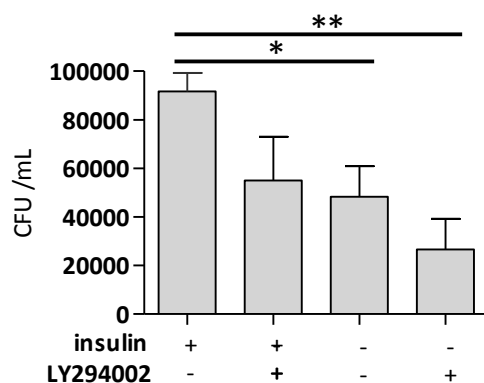


Abbildung 25. Einfluss von Insulin auf die Internalisierung von NTHi in HBEC

HBEC-Monolayer wurden über Nacht ohne Insulin inkubiert und nachfolgend für 30 min mit oder ohne Insulin [5 µg/ml] vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei gleichbleibender Insulinkonzentration in An- oder Abwesenheit des PI3K-Inhibitors LY294002 (Molarität 50 µM) für 2 h mit lebenden NTHi infiziert. Die intrazellulären NTHi-Titer wurden mit Hilfe des NTHi-Internalisierungsassays quantifiziert wie im Methodenteil beschrieben. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert ± Standardabweichung. n=3 pro Gruppe. * \triangleq $p < 0,05$, ** \triangleq $p < 0,01$.

3.17 Die TLR3-induzierte FOXO-Aktivierung übertrifft die insulininduzierte FOXO-Inaktivierung

In den Kapiteln 3.1 und 3.2 wurde gezeigt, dass bakterielle Infektion *in vivo* und *in vitro* in einer Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren resultiert. Es sollte daher zunächst überprüft werden, ob Aktivierung von TLR3 mittels Poly-(I:C) ebenfalls dazu geeignet ist, FOXO zu aktivieren.

FOXO-Transkriptionsfaktoren werden durch Insulin und Wachstumsfaktoren wie IGF-1 PI3K-abhängig inaktiviert [18,22,103,134,146,154,174]. In verschiedenen Studien wurde jedoch gezeigt, dass oxidativer Stress auch bei bestehender PI3K-Aktivität dazu in der Lage ist, FOXO in einen aktivierten Zustand zu überführen [25,193], beispielsweise durch stresskinaseinduzierte Disruption der Interaktion von FOXO mit 14-3-3 [111,170]. Daher sollte weiterhin untersucht werden, welchen Einfluss Poly-(I:C) als immunologischer Stimulus auf die Insulin-abhängige FOXO-Regulation hat.

Für den Versuch wurden Zellen in An- oder Abwesenheit von Insulin für 60 Minuten mit Poly-(I:C) stimuliert. Kontrollen wurden ohne Poly-(I:C) inkubiert. Nach Abschluss des Versuchs wurden die Zellen fixiert und die subzelluläre Lokalisation von FOXO3 wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Abbildung 26 zeigt Ergebnisse dieses Versuchs.

Unter den Grundbedingungen, d.h. in Anwesenheit von Insulin und ohne Poly-(I:C)-Stimulation, zeigte sich für FOXO3 eine prädominante zytoplasmatische Lokalisation bei nukleärer Exklusion, hinweisend auf weitgehende Inaktivierung von FOXO. Insulindepletion führte hingegen zu einer Zunahme der nukleären Fraktion von FOXO3 und einer Abnahme der zytoplasmatischen Fraktion. Dieses in HBEC generierte Ergebnis ist vereinbar mit der in anderen Zelltypen beschriebenen Inhibition von FOXO durch Insulin.

Stimulation von HBEC mit Poly-(I:C) führte zu einer deutlichen Zunahme der nukleären FOXO3-Fraktion unabhängig davon, ob die Zellen zuvor mit Insulin behandelt worden waren oder nicht. Im Falle der insulinbehandelten Zellen konnte somit die insulininduzierte Inaktivierung von FOXO3 durch die TLR3-Stimulation überwunden werden. Im Falle der insulindepletierten Zellen führte Behandlung mit Poly-(I:C) zu einer weiteren Steigerung des nukleären FOXO3-Signals.

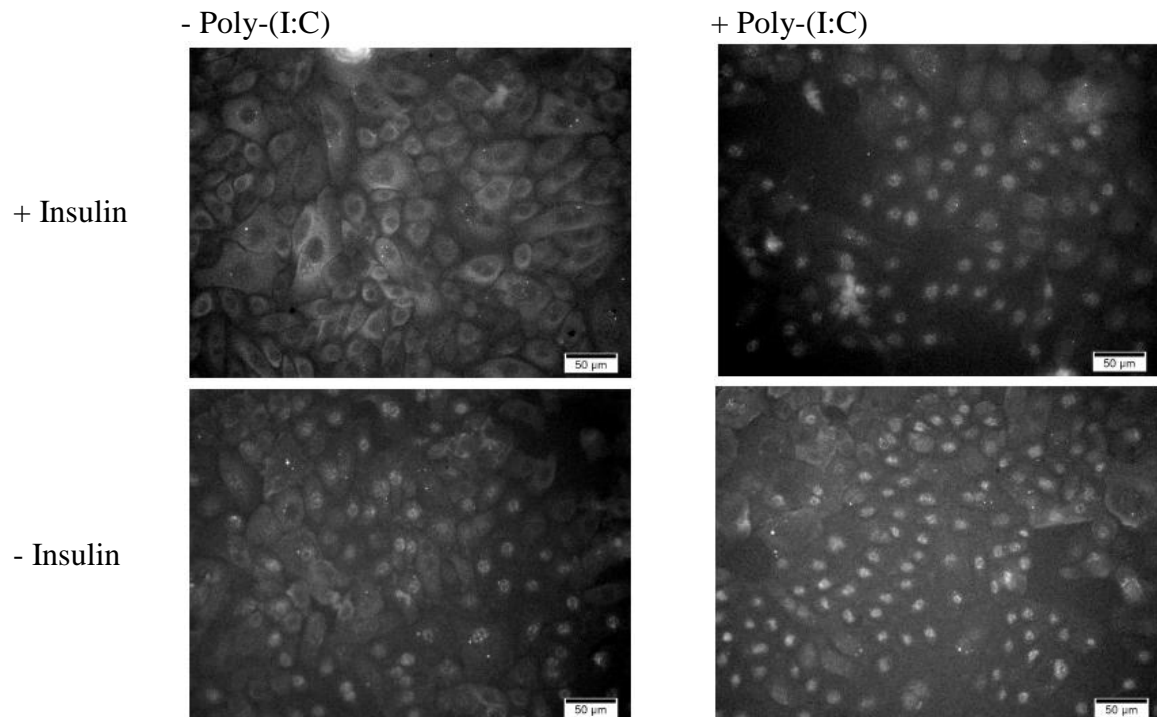


Abbildung 26. Die TLR3-induzierte FOXO-Aktivierung übertrifft die insulininduzierte FOXO-Inaktivierung

HBEC wurden auf Chamberslides kultiviert. Die Zellen wurden über Nacht ohne Insulin inkubiert und anschließend für 30 min mit oder ohne Insulin [5µg/ml] präinkubiert. Danach erfolgte die Stimulation mit Poly-(I:C) [1 µg/ml] für 60 min. Kontrollen wurden nicht stimuliert. FOXO3 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung visualisiert.

3.18 FOXO-Transkriptionsfaktoren sind aktiv in Patienten mit akuter und chronischer Infektion der Atemwege

Um die klinische Relevanz der vorliegenden Ergebnisse zu überprüfen, wurde der Aktivierungszustand von FOXO-Transkriptionsfaktoren in bronchialem Gewebe von Patienten untersucht, bei denen in der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie operative Eingriffe an der Lunge vorgenommen wurden. Das Verfahren wurde durch die Ethikkommission der Landesärztekammer des Saarlandes genehmigt.

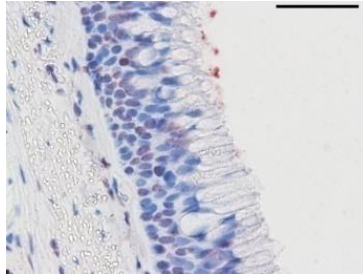
Es wurde ausschließlich tumorfreies Gewebe beurteilt, im Rahmen von Operationen bei Bronchialkarzinom oder bei Lungentransplantationen aus den Absetzungsrandern der Bronchien gewonnen wurde. Das Gewebe wurde unmittelbar nach Entnahme in Formalin fixiert.

Die Proteinmenge von FOXO3 wurde anhand der Intensität der Färbung beurteilt, der

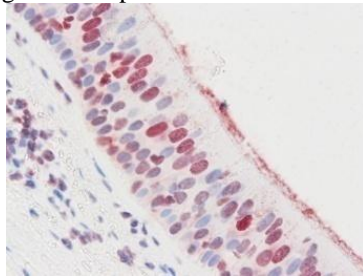
Aktivierungszustand anhand der subzellulären Lokalisation von FOXO3. Als Kontrollen dienten die Proben eines lungengesunden Organspenders und eines Patienten mit Bronchialkarzinom.

Repräsentative Ergebnisse dieser Färbungen sind in

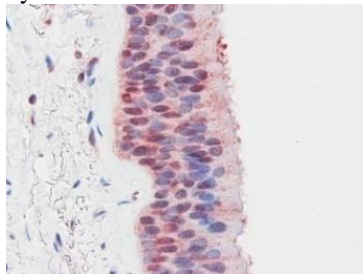
Abbildung 27 gezeigt. In den untersuchten Gewebeschnitten der Kontrollproben war FOXO3 kaum detektierbar. In den Gewebeschnitten der Proben von Patienten mit den infektionsassoziierten Lungenerkrankungen ARDS-Pneumonie, CF und COPD dagegen zeigte sich eine deutliche Vergrößerung sowohl der zytoplasmatischen als auch der nukleären FOXO3-Fraktion. Dies weist auf eine Involvierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren im pathophysiologischen Geschehen akuter und chronischer Infektionen der Atemwege hin.



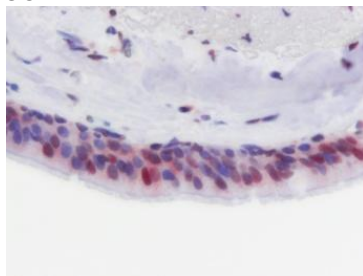
gesunder Spender



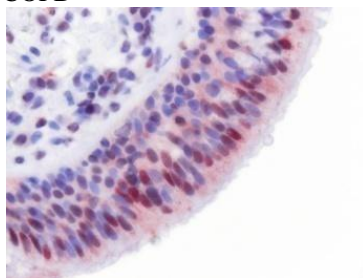
Cystische Fibrose



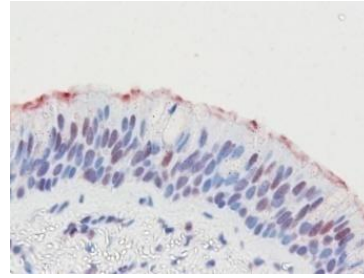
COPD



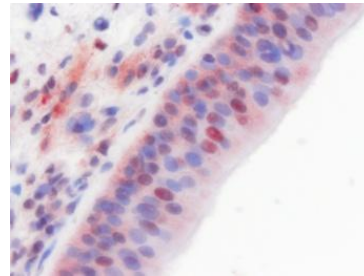
COPD



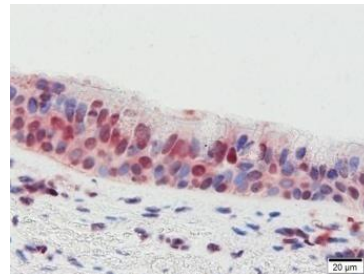
COPD



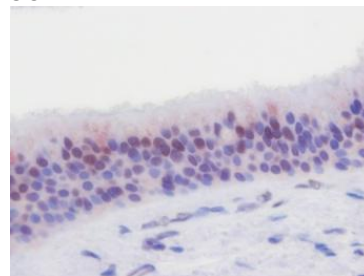
Raucher



ARDS-Pneumonie



COPD



COPD

Abbildung 27. FOXO-Transkriptionsfaktoren sind aktiv in Patienten mit akuter und chronischer Infektion der Atemwege

Mittels Immunhistochemie wurde die subzelluläre Lokalisation von FOXO3 in den bronchialen Gewebeproben eines Organspenders und von Patienten mit Bronchialkarzinom (Raucher, tumorfreies Gewebe), Cystischer Fibrose, ARDS-Pneumonie und COPD bestimmt. FOXO3 ist rot angefärbt. Der Skalierungsbalken zeigt eine Länge von 50 µm an.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Funktion von FOXO-Transkriptionsfaktoren im Rahmen der angeborenen Immunität des Atemwegsepithels analysiert. Hierbei konnten FOXO-Transkriptionsfaktoren als zentrale Regulatoren der angeborenen Immunität identifiziert werden.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass im Verlauf bakterieller Infektionen der Atemwege FOXO-Transkriptionsfaktoren im Atemwegsepithel aktiviert werden. Die Aktivierung wurde in einem murinen Pneumoniemodell, in Zellkultur und in Gewebeproben von Patienten mit infektionsassoziierten Atemwegserkrankungen nachgewiesen.

Weiterhin wurde gezeigt, dass FOXO-Defizienz in einer Suppression der angeborenen Immunität des Atemwegsepithels resultiert. Die Produktion von antimikrobiellen Peptiden und Zytokinen war in FOXO-defizienten Atemwegsepithelzellen sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach infektiologischer Stimulation deutlich attenuiert. Darüber hinaus war in FOXO-defizienten Atemwegsepithelzellen die Zahl intrazellulär nachweisbarer Pathogene nach bakterieller Infektion deutlich erhöht. Im Gegenzug war die Keimzahl nach PI3K-Inhibition vermindert.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das TLR3-Agonist Poly-(I:C) zur Aktivierung von FOXO führt und dass die epitheliale TLR3-vermittelte angeborene Immunantwort FOXO-abhängig ist.

Die Interaktion zwischen FOXO und Insulin in der Regulation der angeborenen Immunantwort wurde charakterisiert. Dabei konnte ein immunomodulatorischer Effekt von Insulin gezeigt werden.

4.1 FOXO-Transkriptionsfaktoren als transkriptionelle Regulatoren der angeborenen Immunität

In den vergangenen Jahren lieferte eine Reihe von Studien Hinweise auf die Beteiligung von FOXO-Transkriptionsfaktoren an inflammatorischen und immunologischen Prozessen. Becker et al. zeigten, dass die Expression von antimikrobiellen Peptiden in *D. melanogaster* unabhängig von der Aktivierung des Toll-Signalwegs durch FOXO

reguliert wird [14]. In *D. melanogaster* bindet FOXO als Transkriptionsfaktor direkt an regulatorische DNA-Regionen von Genen antimikrobieller Peptide und induziert deren Expression. Zudem wurden in dieser Arbeit Ergebnisse aus Experimenten mit humanen Zellkulturen vorgestellt, die darauf hinweisen, dass Inhibition von FOXO durch Insulin zu einer Reduktion der Basisexpression von β -Defensinen führt. In Übereinstimmung mit den Resultaten der Studie von Becker et al. wird in dieser Arbeit gezeigt, dass die Expression des β -Defensins hBD-2 in Atemwegsepithelzellen unter basalen Bedingungen durch FOXO reguliert wird.

In einer Studie von Fan et al. wurde gezeigt, dass FOXO1 an der Verstärkung TLR4-abhängiger Prozesse in Makrophagen beteiligt ist [47]. Die Gruppe konnte dabei nachweisen, dass FOXO1 an regulatorische Elemente innerhalb des TLR4-Gens bindet und somit die Expression von TLR4 steigert. In der vorliegenden Arbeit konnten allerdings keine Änderungen der TLR4-Expression in FOXO1/3-defizienten Atemwegsepithelzellen beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass FOXO die angeborene Immunität nicht allein über Regulation des TLR4-Gens beeinflusst. So beschrieben Su et al., dass die Expression von IL-1 β in Makrophagen der direkten Kontrolle von FOXO1 unterliegt [169]. Eine Vielzahl weiterer Faktoren innerhalb der TLR-Signalkaskade, die als potenzielle FOXO-Zielgene in Frage kommen, wurde von Fan et al. im Rahmen in einer *in-silico*-Analyse identifiziert, darunter IL-6, IP-10 und TNF [47]. Diese theoretische Vorhersage konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass die Expression bzw. Freisetzung von IL-6, IP-10 und TNF in FOXO1/3-defizienten Atemwegsepithelzellen deutlich verringert ist und deren Anstieg auf infektiologische Stimulation abgeschwächt ist. Das IL-8-Gen wurde von Fan et al. nicht als direktes FOXO-Zielgen vorhergesagt. Dennoch wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Freisetzung von IL-8 FOXO-abhängig ist. FOXO-Transkriptionsfaktoren sind folglich dazu in der Lage, auf indirektem Wege die Expression von Genen zu vermitteln, die keine FOXO-Zielgene im engeren Sinne darstellen. Die Begründung hierfür liegt möglicherweise darin, dass FOXO die Expression von Faktoren, die an der TLR-Signaltransduktion beteiligt sind, reguliert. Zudem ist bekannt, dass FOXO die Transkription von Genen auch ohne direkte DNA-Bindung beeinflussen kann [42]. Gleichfalls denkbar ist eine kooperativ induzierte Genregulation durch Protein-Proteininteraktion von FOXO mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B [113,169].

4.2 FOXO-Transkriptionsfaktoren und spezifisches Antwortverhalten von Atemwegsepithelzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in FOXO1/3-defizienten Atemwegsepithelzellen die Expression und Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und antimikrobieller Peptide nach Stimulation mit NTHi und *P. aeruginosa* vermindert ist. Für IL-6 nach Stimulation mit *P. aeruginosa* war dies jedoch nicht der Fall. Da IL-6 Zielgen einer Vielzahl von Signalwegen ist, wurde angenommen, dass der Effekt der FOXO-Defizienz durch das breite Spektrum der von *P. aeruginosa* exprimierten PAMPs maskiert wird. Der *P. aeruginosa*-Stamm PAO1, mit dem in diesen Experimenten gearbeitet wurde, produziert u.a. Flagellin, den Aktivator von TLR5 [207], das den MyD88-abhängigen Signalweg aktiviert. Die Stimulationsexperimente mit Flagellin zeigten, dass die TLR5-vermittelte Induktion von IL-6 in FOXO-defizienten Atemwegsepithelzellen nicht kompromittiert war. Somit ist die Induktion TLR5-abhängiger Faktoren durch *P. aeruginosa* FOXO-unabhängig.

In der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus untersucht, ob FOXO-Transkriptionsfaktoren an der zytokinvermittelten Induktion der angeborenen Immunantwort von Atemwegsepithelzellen beteiligt sind. Dazu wurden Zellen mit IL-1 β stimuliert, einem Zytokin, das den MyD88-abhängigen Signalweg aktiviert [3]. Es zeigte sich, dass durch FOXO1/3-silencing die Freisetzung von IL-6 nach Stimulation mit IL-1 β nicht reduziert wird. Tatsächlich war in den FOXO1/3-defizienten Zellen die Menge an freigesetztem IL-6 sogar signifikant erhöht. In einer Studie von Li et al. wurde gezeigt, dass Stimulation der renalen epithelialen Zelllinie 293T mit IL-1 β und TNF zur Phosphorylierung von FOXO3 an T32 führt, was zur Inaktivierung von FOXO3 führt [113]. Es ist daher denkbar, dass FOXO-Transkriptionsfaktoren unter Ruhebedingungen inhibierend auf die IL-1 β -abhängige Signaltransduktion einwirken und Stimulation mit IL-1 β zur Disinhibition dieser Prozesse im Sinne eines Feed-forward-Mechanismus führt. FOXO1/3-silencing kann möglicherweise zusätzlich zu dieser disinhibitorischen Regulation beitragen. Im Kontrast hierzu wurde in einer Arbeit von Dobierzewska et al. gezeigt, dass FOXO1 in Hepatozyten durch IL-1 β aktiviert wird [39]. Beachtet werden sollte hierbei die Tatsache, dass die genannten Studien in funktionell deutlich abweichenden Zelltypen durchgeführt wurden, wobei bekannt ist, dass die Regulation von FOXO zelltypspezifisch ist [158]. Eine genauere Beurteilung dieses Sachverhalts wird durch die derzeitige Datenlage nicht zugelassen.

4.3 FOXO-Transkriptionsfaktoren als Mediatoren endosomaler TLR-Signaltransduktion

In einer Studie von Morey et al. wurde gezeigt, dass NTHi durch Atemwegsepithelzellen internalisiert werden und in das endosomale Kompartiment gelangen [129]. Im endosomalen Kompartiment lokalisierte Pathogene können durch endosomale Reifung und Verschmelzung mit Lysosomen abgetötet werden [62]. Die Azidifizierung führt zudem zu einer Steigerung der Menge von den Pathogenen freigesetzter PAMPs [27]. Diese werden von endosomalen Toll-like-Rezeptoren erkannt, wodurch es zur Entstehung einer angeborenen Immunreaktion kommt [144].

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten zur *in-vitro*-Infektion von Atemwegsepithelzellen mit NTHi zeigte sich, dass FOXO nicht in allen Zellen, sondern fokal in bestimmten Einzelzellen aktiviert wurde. Dies lässt die Vermutung zu, dass FOXO nur in den Zellen aktiviert wird, die Bakterien internalisiert haben. Des Weiteren wurde beobachtet, dass mit Antibiotika inaktivierte Bakterien eher dazu geeignet waren, eine angeborene Immunantwort auszulösen als lebende Bakterien. Es wurde daher angenommen, dass durch das Abtöten der Bakterien eine größere Menge an PAMPs freigesetzt wird, wodurch Mechanismen, die auf Internalisierung und Prozessierung von Pathogenen angewiesen sind, stärker aktiviert werden.

Vor diesem Hintergrund wurde die Hypothese aufgestellt, dass FOXO-Transkriptionsfaktoren über einen Mechanismus aktiviert werden, der die endosomale Erkennung bakterieller PAMPs voraussetzt. Dies wird weiter unterstrichen durch die in der vorliegenden Arbeit angestellte Beobachtung, dass die TLR5- bzw. IL-1 β -induzierten Prozesse, die den MyD88-abhängigen Signalweg aktivieren, nicht durch FOXO-Silencing beeinträchtigt werden. Um die Hypothese zu überprüfen, sollte der Zusammenhang zwischen FOXO-Transkriptionsfaktoren und der Signaltransduktion durch endosomale Toll-like-Rezeptoren analysiert werden.

Der wichtigste endosomale Toll-like-Rezeptor zur Detektion gramnegativer Bakterien wie NTHi ist TLR4, ein Rezeptor für Lipopolysaccharid. TLR4 ist allerdings nicht nur im Endosom, sondern auch auf der Oberfläche von Atemwegsepithelzellen vorhanden. Endosomales und Oberflächen-TLR4 setzen dabei unterschiedliche Mechanismen der Signaltransduktion in Gang. Während endosomale Stimulation von TLR4 den MyD88-unabhängigen TRIF-Pfad aktiviert, führt Stimulation von Oberflächen-TLR4 zur klassischen MyD88-abhängigen NF- κ B-Aktivierung. Methodisch ist es schwierig,

spezifisch endosomales TLR4 zu stimulieren und so selektiv den endosomal-getriggerten TRIF-Weg zu aktivieren, ohne den MyD88-abhängigen Signalweg in Gang zu setzen. Daher wurde der TLR4-Signalweg in diesem Zusammenhang nicht näher untersucht. Stattdessen wurde TLR3 als Modell für endosomale TLR-Signaltransduktion gewählt. TLR3 ist beschrieben als Rezeptor für virale ds-RNA [95] und Wirts-RNA [92] (d.h. RNA, die bei Zellschädigung aus körpereigenen Zellen freigesetzt wird). TLR3 wird, anders als TLR4, in Atemwegsepithelzellen ausschließlich endosomal exprimiert [64], so dass endosomales TLR3 leicht mit Hilfe des synthetischen Agonisten Poly-(I:C) zu adressieren ist. Aktivierung von TLR3 führt wie die von endosomalem TLR4 zur Aktivierung von TRIF. Daher resultieren beide TLR-Signalwege in den gleichen zellulären Ereignissen, so dass die Analyse durch TLR3 ausgelöster Prozesse Rückschlüsse auf TLR4 erlaubt. Daher erscheint TLR3, trotz seiner überwiegenden Eigenschaft als Rezeptor für virale RNA, als ein interessantes Modell für Fragestellungen, die sich mit der Aktivierung von endosomalem TLR4 durch bakterielle PAMPs beschäftigen. Zudem liefern mehrere Studien Hinweise darauf, dass TLR3 auch direkt an der Vermittlung angeborener Immunreaktionen auf bakterielle Reize, wie Infektion mit NTHi, beteiligt ist [157,177].

Um zu überprüfen, ob FOXO-Transkriptionsfaktoren für die TLR3-vermittelte angeborene Immunität von Bedeutung sind, wurden FOXO1/3-defiziente Atemwegsepithelzellen mit Poly-(I:C) behandelt. Während in Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden, durch Poly-(I:C) eine robuste angeborene Immunantwort induziert wurde, war die Expression bzw. Freisetzung inflammatorischer Marker in FOXO1/3-defizienten Zellen auf Werte unterhalb des Basalniveaus in Kontrollzellen supprimiert, hinweisend darauf, dass eine suffiziente TLR3-induzierte Genexpression in Abwesenheit von FOXO nicht möglich ist. Diese in Calu-3-Zellen ermittelten Daten konnten in primären HBEC qualitativ bestätigt werden (siehe auch Kapitel 4.5). FOXO-Transkriptionsfaktoren scheinen somit essenziell für die TLR3-vermittelte angeborene Immunantwort zu sein.

4.4 FOXO-Transkriptionsfaktoren und Internalisierung von Pathogenen in Atemwegsepithelzellen

Ein in dieser Arbeit verwendeter Ansatz zur Beurteilung der Funktion von FOXO-Transkriptionsfaktoren innerhalb der angeborenen Immunität ist der NTHi-Internalisierungsassay. Es handelt sich hierbei um eine etablierte Methode zur Detektion intrazellulärer Bakterien [129,172]. Es wurden drei verschiedene Herangehensweisen gewählt: PI3K-Inhibition mit LY294002, PI3K-Aktivierung mit Insulin und FOXO1/3-Silencing mit siRNA. Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass Inhibition des PI3K-Signalwegs, die mit der Aktivierung von FOXO einhergeht [22], zur Verringerung der Invasivität von NTHi in Atemwegsepithelzellen beiträgt, während Behandlung mit Insulin die Zahl intrazellulärer Pathogene erhöht. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass auch FOXO1/3-silencing in einer erhöhten Zahl intrazellulär nachweisbarer Bakterien resultiert. Ähnliche Daten wurden durch Morey et al. bereits für Alveolarepithelzellen vorgelegt [129]. Übereinstimmend mit den hier gezeigten Daten wurde in deren Studie gezeigt, dass Internalisierung von NTHi eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs voraussetzt. Die Inhibition von FOXO-Transkriptionsfaktoren stellt daher einen möglichen Mechanismus dar, über den via PI3K die bakterielle Invasivität gesteigert wird.

Als Grund für die gesteigerte Nachweisbarkeit von Pathogenen in FOXO-defizienten Zellen sind zwei Alternativen denkbar, die beide vereinbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit sind. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der genaue Stellenwert der Internalisierung für die Interaktion zwischen Wirt und Pathogen und die zugrunde liegenden Mechanismen bisher nur unvollständig verstanden sind.

Eine Möglichkeit besteht darin, dass NTHi in FOXO-defiziente Zellen leichter eindringen können. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die Produktion antimikrobieller Peptide wie hBD-2 in FOXO-defizienten Zellen deutlich reduziert, wodurch das Abtöten adhärenter und endosomaler Bakterien eingeschränkt sein könnte. Diese Begründung entspricht der Annahme, dass die Internalisierung von Bakterien ein Prozess ist, der durch das Pathogen selbst induziert wird um eine endosomale Population zu generieren, die vor dem Zugriff des Immunsystems geschützt ist. Dies wurde bereits für *Moraxella catarrhalis* postuliert, ein weiteres häufig bei COPD nachweisbares Pathogen [168]. Morey et al. argumentieren, dass aus solchen intrazellulären Reservoirs wieder

extrazelluläre Bakterien rekrutiert werden können und somit die Kolonialisierung mit NTHi etabliert wird [129].

Die alternative Möglichkeit ist, dass Epithelzellen Bakterien aktiv internalisieren um sie endosomal zu prozessieren. Bei der CF wurde die Unfähigkeit von Epithelzellen, *P. aeruginosa* CFTR-abhängig zu endozytieren, als eine Ursache für die Etablierung chronischer Atemwegsinfektionen beschrieben [148]. Dies steht möglicherweise in Zusammenhang mit der Beobachtung, dass die Oberflächenexpression von TLR4 in Epithelzellen bei CF signifikant reduziert ist und die Zellen auf die endosomale TLR4-Aktivierung angewiesen sind [88]. Die endosomale Prozessierung internalisierter Pathogene, die mit Azidifizierung des Endosoms, Andauung des Pathogens und daraus resultierender Freisetzung mikrobieller PAMPs einhergeht, wird als ein entscheidender Schritt für die Aktivierung endosomaler Toll-like-Rezeptoren angesehen [27]. Dies ist vereinbar mit der Beobachtung, dass mittels Antibiotika angedaute NTHi die angeborene Immunität effektiver stimulierten als lebende NTHi. Demnach ist die Internalisierung von Pathogenen eine Funktion der angeborenen Immunität der Wirtszelle mit dem Ziel, mikrobielle PAMPs zu detektieren und damit eine entsprechende Immunantwort zu induzieren. Es ist denkbar, dass FOXO-defiziente Zellen zwar Bakterien aufnehmen, diese jedoch aufgrund verringerter antimikrobieller Aktivität nicht abtöten können. Dies würde zu einer verminderten Menge detektierbarer PAMPs führen, wodurch Effektormechanismen, die abhängig von endosomaler TLR-Stimulation sind, beeinträchtigt werden könnten.

4.5 FOXO-Transkriptionsfaktoren als Integratoren metabolischer und immunologischer Stressoren

Die Rolle von FOXO-Transkriptionsfaktoren in der angeborenen Immunität ist bisher nur unvollständig verstanden. In verschiedenen Studien wurden sowohl proinflammatorische [14,47] als auch antiinflammatorische Effekte beschrieben [83,116]. Dies stellt nicht notwendigerweise ein Paradoxon dar, sofern man die Erkenntnisse bezüglich FOXO im Zusammenhang mit oxidativer Zellschädigung in Betracht zieht. Es gehört zum gesicherten Wissen, dass FOXO auf oxidativen Stress hin sowohl pro-, als auch antiapoptotisch wirksam sein kann [1,59,60]. Die Grundlage für die Fähigkeit von FOXO,

scheinbar konträre Funktionen einzunehmen, liegt in der Vielzahl möglicher posttranslationaler Modifikationen. Das transkriptionelle Programm von FOXO wird nicht allein durch nukleäre Präsenz bestimmt, sondern durch das individuelle Muster von Phosphorylierungen, Ubiquitinierungen und Acetylierungen [59]. Dieses Muster wurde als „FOXO Code“ [26] bezeichnet, der die transkriptionelle Aktivität von FOXO an seinen verschiedenen Zielgenen steuert. Es wird angenommen, dass durch diese Form epigenetischer Kodierung das Zusammenspiel von FOXO und diversen Co-Faktoren modifiziert wird [42]. Die Zelle ist somit in der Lage adäquat und dosisspezifisch auf zellulären Stress unterschiedlichen Ausmaßes zu reagieren: während FOXO bei moderater DNA-Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur vermittelt, kommt es bei schwerer Schädigung zur FOXO-abhängigen Transkription proapoptotischer Gene [26]. Zurückgeführt wird dies beispielsweise auf SIRT-abhängige Veränderungen des Acetylierungsstatus von FOXO [25,86,102].

In dieser Arbeit wurde die Integrität der Zellen mittels morphologischer Analyse und eines LDH-Zytotoxizitätslevels überwacht. Obwohl die Behandlung von Zellen mit Poly-(I:C) in einer Konzentration von 1 µg/ml zu einer starken nukleären Aktivität von FOXO in insulindepletierten HBEC führte, ließen sich keine Hinweise auf eine relevante Steigerung der Zelltodrate durch diese Behandlung feststellen. Auch konnte keine Steigerung der Expression von Bim nachgewiesen werden, einem proapoptischen Gen aus der Bcl-2-Familie, das als FOXO-Zielgen bekannt ist und dessen Expression auf verschiedene Stressstimuli hin induziert wird [38]. In einer Studie von Numata et al. wurde gezeigt, dass Behandlung insulindepletierter HBEC mit Poly-(I:C) in einer Konzentration von 10 µg/ml zur TLR3-vermittelten Apoptose führt [139]. Eine mögliche Involvierung FOXO-abhängiger proapoptotischer Prozesse wurde von den Autoren nicht untersucht. Im Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist FOXO jedoch ein potenzieller Faktor innerhalb der TLR3-vermittelten Apoptose. Demnach ist es denkbar, dass Aktivierung von FOXO bei moderater TLR3-Stimulation, wie in dieser Arbeit gezeigt, zur Vermittlung einer Immunreaktion führt, während übermäßige Stimulation dosisabhängig zu einer Verschiebung des transkriptionellen Programms von FOXO hin zur Expression proapoptotischer Faktoren bewirkt.

Nach derzeitigem Verständnis erfolgt die basale Regulation der Aktivität von FOXO-Transkriptionsfaktoren über den PI3K-AKT-Signalweg [69]. Dessen Aktivierung durch Insulin oder Wachstumsfaktoren führt zur Sequestrierung von FOXO im Zytosol [22,103], sowie nachfolgend zur Polyubiquitinierung, die FOXO für die proteasomale

Degradation markiert [81]. Unter oxidativen Stressbedingungen kann die Inaktivierung von FOXO durch Stresskinasen aufgehoben werden. Stresskinasen wie JNK aktivieren FOXO entweder durch direkte Phosphorylierung oder indirekt durch Inaktivierung von Adapterproteinen [59]. Dadurch kommt es zur Aktivierung von FOXO, unabhängig von den PI3K-abhängig induzierten inhibitorisch wirksamen posttranslationalen Modifikationen [25,44].

Ein ähnlicher Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Behandlung von HBEC mit Insulin führte wie erwartet zur Exklusion von FOXO aus dem Zellkern, während Insulindepletion zur nukleären Translokation führte. Stimulation mit Poly-(I:C) resultierte hingegen sowohl in den insulindepletierten als auch in den mit Insulin behandelten Zellen in einer Aktivierung von FOXO. TLR3-Stimulation übertrifft somit die insulinabhängige Inhibition von FOXO. Die Stärke des nukleären FOXO-Signals nach Poly-(I:C)-Stimulation erreichte jedoch in insulinbehandelten HBEC nicht das Niveau der insulindepletierten Zellen. Dies weist darauf hin, dass die FOXO-vermittelte angeborene Immunität durch Insulin zwar nicht völlig ausschaltet, aber möglicherweise beeinträchtigt werden kann, wobei möglicherweise auch individuelle Unterschiede in Betracht zu ziehen sind.

Die siRNA-Versuche mit HBEC zweier verschiedener Spender (s. Abbildung 24) stützen diese Hypothese. Während bei Spender 1 die Insulinkonzentration alleine keinen wesentlichen Effekt auf die Expression bzw. Freisetzung von hBD-2, IL-6 und IP-10 hat, scheint eine hohe Insulinkonzentration bei Spender 2 zum Teil immunsuppressive Effekte zu vermitteln. Bei Spender 1 ist ein solcher Effekt erst im Zusammenspiel mit FOXO-Silencing erkennbar: unter der niedrigen Insulinkonzentration führte FOXO-Silencing nicht zu einer Suppression der Freisetzung von IL-6 und IP-10 nach Poly-(I:C)-Stimulation. Wie in Kapitel 3.14 gezeigt, ist die Expression von FOXO1 und FOXO3 nach siRNA-Transfektion zwar signifikant reduziert, jedoch nicht vollkommen unterbunden. Insofern ist es möglich, dass die Restmenge an FOXO-Transkriptionsfaktoren ausreicht, bestimmte Funktionen der angeborenen Immunität aufrechtzuerhalten, wenn sie sich in einem hochaktivierten Zustand befindet. Bei zusätzlicher Inhibition des verbliebenen FOXO-Proteinanteils durch eine hohe Insulinkonzentration kommt es zu einer deutlichen Beeinträchtigung der angeborenen Immunantwort. hBD-2 ist bei beiden Spendern bereits durch FOXO-Silencing alleine herunter reguliert. Bei Spender 1 führt zusätzliche Erhöhung der Insulinkonzentration zu einer weiteren Reduktion der hBD-2-Expression auf Werte unterhalb des Basalniveaus.

Bei Spender 2 wirkt bereits Insulin alleine stark suppressiv auf hBD-2, was durch zusätzliches FOXO-Silencing nicht weiter forciert werden kann. Qualitativ ähnliche Ergebnisse zeigen beide Spender bei IP-10, wobei in Spender 2 die Effekte von FOXO-Silencing und Insulin alleine jeweils deutlicher sind.

Als mögliche Gründe für die beobachteten Unterschiede zwischen den Spendern sind mehrere Aspekte in Betracht zu ziehen. Zum einen sind bereits *in vivo* vorhandene Unterschiede in der Insulinresponsibilität denkbar. Zum anderen ist es möglich, dass die tatsächliche Effektivität des FOXO-Silencings im Versuchszeitraum nicht übereinstimmend war. Zudem scheinen die Zellen von Spender 2 eine generell höhere immunologische Aktivität aufzuweisen.

Zusammengefasst kann Insulin möglicherweise die angeborenen Immunfunktionen von Atemwegsepithelzellen durch Modulation der Funktion von FOXO beeinflussen, wenn auch nicht in jedem Fall supprimieren.

Die gezeigten Daten liefern somit erste Hinweise auf die zugrundeliegenden Mechanismen der FOXO-Aktivierung bei Infektion. Das Aktivierungsverhalten auf Poly-(I:C)-Stimulation spricht hierbei für einen TLR-vermittelten Prozess, während die regulatorische Interaktion von Insulin und TLR3-Stimulation den o.g. JNK-vermittelten Regulationsmechanismen bei oxidativem Stress ähnelt. Dies ist insofern interessant, als TLR3 in der Lage ist, TRIF-abhängig JNK zu aktivieren [71]. Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass die Aktivierung von FOXO1 durch IL-1 β , dessen Rezeptor eng mit den TLRs verwandt ist [19], JNK-abhängig und AKT-unabhängig erfolgt [39]. Auch in *C. elegans* ist das FOXO-Ortholog DAF-16 unabhängig vom Insulinsignalweg durch infektiöse Stimuli aktivierbar [210].

4.6 Die Rolle von FOXO bei akuter und chronischer Infektion der Lunge

Wie in Kapitel 3.1 gezeigt wurde, werden FOXO-Transkriptionsfaktoren bei akuter Atemwegsinfektion aktiviert. Die Ergebnisse der Experimente mit FOXO-defizienten Atemwegsepithelzellen weisen dabei klar darauf hin, dass FOXO essenziell an der Entstehung einer adäquaten Immunreaktion des Atemwegsepithels beteiligt ist. Andererseits zeigte sich bei der Analyse von humanem Bronchialgewebe (s. Kapitel 3.18), dass FOXO auch bei COPD und CF, Erkrankungen die mit chronischer

Inflammation und progredienter Schädigung der Atemwege einhergehen, aktiv ist. Es stellt sich daher die Frage, ob FOXO im infektiösen Geschehen eine für den Organismus protektive Funktion erfüllt, oder ob FOXO selbst möglicherweise negativen Einfluss auf den Verlauf von Infektionen der Atemwege hat.

Die Immunreaktion des Körpers auf infektiöse Stimuli hat zum Ziel, das infektiöse Agens zu erkennen und zu eliminieren. Dabei können bei immunkompetenten Individuen mit Hilfe der Mechanismen der angeborenen und adaptiven Immunität akute Infektionen ohne Folgeschäden für den Organismus geklärt werden. Dies gilt prinzipiell auch für schwere Infektionen wie eine mit ARDS einhergehende Pneumonie, die, wenn sie überlebt wird, in einem Großteil der Fälle ohne Residuen ausheilt [122,194]. Damit ist die Immunreaktion bei akuter Infektion ein sinnvoller und lebensnotwendiger Prozess.

Bei chronischen Erkrankungen, die durch persistierende bakterielle Kolonisation gekennzeichnet sind, können Infektionen nicht nachhaltig geklärt werden. Durch die persistierende bakterielle Stimulation des Immunsystems kommt es zu dessen Daueraktivierung, die im Falle der COPD und der CF entscheidend zur Pathophysiologie der Atemwegsdestruktion beiträgt [33,164].

Vor diesem Hintergrund ist die Rolle von FOXO bei Infektionen differenziert zu betrachten. Bei der akuten Infektion trägt FOXO möglicherweise im Atemwegsepithel dazu bei, Pathogene direkt zu eliminieren, sowie professionelle Immunzellen durch Zytokine zu rekrutieren. Diese protektive Aktivität ist jedoch bei chronischen Infektionen der Lunge offenbar nicht adäquat für die Beseitigung des mikrobiellen Agens, vielmehr ist sogar denkbar, dass die durch FOXO vermittelten Prozesse zur Aufrechterhaltung und Progredienz der Erkrankung beitragen. Dabei ist die Rolle von FOXO möglicherweise individuell verschieden. In einer 2013 veröffentlichten Studie wurde ein Polymorphismus von FOXO3 identifiziert, der in Makrophagen das Gleichgewicht von pro- hin zu antiinflammatorischen Zytokinen verschiebt [109]. Dieses Allel ist assoziiert mit besserem Outcome bei autoimmunologischen Erkrankungen wie M. Crohn und der Rheumatoiden Arthritis, führt jedoch aufgrund der verringerten Immunstimulation durch proinflammatorische Faktoren zu schwereren Verläufen bei Infektionen. Somit liefert die Varianz individueller FOXO-Genotypen in der Bevölkerung einen möglichen Ansatz zur Erklärung der großen Variabilität im Verlauf akuter und chronischer Erkrankungen, wie sie beispielsweise auch bei COPD und CF typisch ist.

4.7 Ausblick

Gemeinsam mit anderen in den letzten Jahren publizierten Studien eröffnet diese Arbeit ein neues und dynamisches Forschungsfeld. Zu den Fragen, die sich aus der derzeitigen Datenlage ergeben, gehört zum einen, über welche Mechanismen FOXO-Transkriptionsfaktoren im Verlauf einer Infektion aktiviert werden, wie bereits in Kapitel 4.5 diskutiert wurde. Zum anderen ist bislang unklar über welche Mechanismen FOXO seinerseits an der Vermittlung der angeborenen Immunantwort teilnimmt. Promotoranalysen können hierbei Aufschluss darüber geben, ob FOXO möglicherweise eine direkte Funktion als Transkriptionsfaktor angeborener Immunfaktoren einnimmt und inwiefern isolierte FOXO-Aktivierung hinreichend für die Transkription proinflammatorischer Zytokine und Interferon-I-induzierbarer Gene ist. Eine indirekte Beeinflussung der Transkription durch Protein-Protein-Interaktion von FOXO mit weiteren Faktoren innerhalb der TLR-Signaltransduktion, wie NF- κ B und IRF3, ist gleichermaßen denkbar.

Ebenfalls interessant ist die Frage nach dem jeweiligen individuellen Beitrag der hier untersuchten Faktoren FOXO1 und FOXO3, sowie nach einer möglichen Beteiligung der weiteren FOXO-Vertreter FOXO4 und FOXO6. Zur genauen Untersuchung der jeweiligen Funktion wären hierbei insbesondere Studien an transgenen Tiermodellen geeignet.

Die Identifikation und Charakterisierung verschiedener Polymorphismen von FOXO, die mit Langlebigkeit bzw. bestimmten (milden oder schwerwiegenden) Verläufen immunologischer und infektiologischer Erkrankungen assoziiert sind, eröffnen darüber hinaus neue Perspektiven im Hinblick auf die Erstellung individueller Prognosen und die Entwicklung der personalisierten Medizin.

5 Literaturverzeichnis

1. Accili D, Arden KC (2004) FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 117: 421–426
2. Akashi-Takamura S, Miyake K (2008) TLR accessory molecules. *Current Opinion in Immunology* 20: 420–5
3. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783–801
4. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732–8
5. Andjelković M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 31515–24
6. Anselmi CV, Malovini A, Roncarati R, Novelli V, Villa F, Condorelli G, Bellazzi R, Puca AA (2009) Association of the FOXO3A locus with extreme longevity in a southern Italian centenarian study. *Rejuvenation Research* 12: 95–104
7. Anyanful A, Easley KA, Benian GM, Kalman D (2009) Conditioning protects *C. elegans* from lethal effects of enteropathogenic *E. coli* by activating genes that regulate lifespan and innate immunity. *Cell Host & Microbe* 5: 450–62
8. Aoki M, Jiang H, Vogt PK (2004) Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 13613–7
9. Arthur JSC, Ley SC (2013) Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature Reviews. Immunology* 13: 679–92

-
10. Bakker WJ, Blázquez-Domingo M, Kolbus A, Besooyen J, Steinlein P, Beug H, Coffe PJ, Löwenberg B, von Lindern M, van Dijk TB (2004) FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *The Journal of Cell Biology* 164: 175–84
 11. Bals R, Beisswenger C, Blouquit S, Chinet T (2004) Isolation and air-liquid interface culture of human large airway and bronchiolar epithelial cells. *Journal of Cystic Fibrosis* 3 Suppl 2: 49–51
 12. Bals R, Hiemstra PS (2004) Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *The European Respiratory Journal : Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 23: 327–33
 13. Bandi V, Apicella MA, Mason E, Murphy TF, Siddiqi A, Atmar RL, Greenberg SB (2001) Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the lower respiratory tract of patients with chronic bronchitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164: 2114–9
 14. Becker T, Loch G, Beyer M, Zinke I, Aschenbrenner AC, Carrera P, Inhester T, Schultze JL, Hoch M (2010) FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. *Nature* 463: 369–373
 15. Beisswenger C, Bals R (2005) Antimicrobial peptides in lung inflammation. *Chemical Immunology and Allergy* 86: 55–71
 16. Beisswenger C, Kandler K, Hess C, Garn H, Felgentreff K, Wegmann M, Renz H, Vogelmeier C, Bals R (2006) Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense. *The Journal of Immunology* 177: 1833–1837
 17. Biggs WH, Cavenee WK, Arden KC (2001) Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. *Mammalian Genome* 12: 416–425
 18. Biggs WH, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged

-
- helix transcription factor FKHR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 7421–7426
19. Bowie A, O'Neill LA (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology* 67: 508–14
 20. Braccini L, Ciraolo E, Martini M, Pirali T, Germena G, Rolfo K, Hirsch E (2012) PI3K keeps the balance between metabolism and cancer. *Advances in Biological Regulation* 52: 389–405
 21. Brenkman AB, de Keizer PLJ, van den Broek NJF, Jochemsen AG, Burgering BMT (2008) Mdm2 induces mono-ubiquitination of FOXO4. *PloS One* 3: e2819
 22. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857–868
 23. Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni J V, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, Yaffe MB (2002) 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *The Journal of Cell Biology* 156: 817–28
 24. Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME (2001) Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Molecular and Cellular Biology* 21: 952–65
 25. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng H-L, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, et al. (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303: 2011–2015
 26. Calnan DR, Brunet A (2008) The FoxO code. *Oncogene* 27: 2276–88

-
27. Campodónico VL, Gadjeva M, Paradis-Bleau C, Uluer A, Pier GB (2008) Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Trends in Molecular Medicine* 14: 120–133
 28. Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655–7
 29. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel D V (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383: 443–6
 30. Carter ME, Brunet A (2007) FOXO transcription factors. *Current Biology* 17: R113–4
 31. Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL (2008) TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *The Journal of Experimental Medicine* 205: 2609–21
 32. Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* 364: 412–20
 33. Cohen TS, Prince A (2012) Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nature Medicine* 18: 509–19
 34. Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P (1990) Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Molecular and Cellular Biology* 10: 1498–506
 35. Cramer N, Wiehlmann L, Ciofu O, Tamm S, Høiby N, Tümmler B (2012) Molecular epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infections in cystic fibrosis. *PloS One* 7: e50731
 36. Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M, Nakajima T, Fukamizu A (2004) Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 10042–7

-
37. Daitoku H, Sakamaki J-I, Fukamizu A (2011) Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813: 1954–60
 38. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ (2000) Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Current Biology* 10: 1201–4
 39. Dobierzewska A, Shi L, Karakashian AA, Nikolova-Karakashian MN (2012) Interleukin 1 β regulation of FoxO1 protein content and localization: evidence for a novel ceramide-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 44749–60
 40. Dorman JB, Albinder B, Shroyer T, Kenyon C (1995) The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 141: 1399–406
 41. Eddens T, Kolls JK (2012) Host defenses against bacterial lower respiratory tract infection. *Current Opinion in Immunology* 24: 424–30
 42. Eijkelenboom A, Burgering BMT (2013) FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14: 83–97
 43. Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews. Genetics* 7: 606–19
 44. Essers MAG, Weijzen S, De Vries-Smits AMM, Saarloos I, De Ruiter ND, Bos JL, Burgering BMT (2004) FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *The EMBO Journal* 23: 4802–4812
 45. Evans EA, Chen WC, Tan M-W (2008) The DAF-2 insulin-like signaling pathway independently regulates aging and immunity in *C. elegans*. *Aging Cell* 7: 879–93

-
46. Evans EA, Kawli T, Tan M-W (2008) *Pseudomonas aeruginosa* suppresses host immunity by activating the DAF-2 insulin-like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathogens* 4: e1000175
 47. Fan W, Morinaga H, Kim JJ, Bae E, Spann NJ, Heinz S, Glass CK, Olefsky JM (2010) FoxO1 regulates Tlr4 inflammatory pathway signalling in macrophages. *The EMBO Journal* 29: 4223–4236
 48. Fernández de Mattos S, Essafi A, Soeiro I, Pietersen AM, Birkenkamp KU, Edwards CS, Martino A, Nelson BH, Francis JM, Jones MC, Brosens JJ, Coffey PJ, Lam EW-F (2004) FoxO3a and BCR-ABL regulate cyclin D2 transcription through a STAT5/BCL6-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Biology* 24: 10058–71
 49. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *The Journal of Experimental Medicine* 198: 1043–55
 50. Flachsbart F, Caliebe A, Kleindorp R, Blanché H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, Schreiber S, Nebel A (2009) Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 2700–5
 51. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC (1998) Phosphoinositide kinases. *Annual Review of Biochemistry* 67: 481–507
 52. Fu W, Ma Q, Chen L, Li P, Zhang M, Ramamoorthy S, Nawaz Z, Shimojima T, Wang H, Yang Y, Shen Z, Zhang Y, Zhang X, Nicosia S V, Zhang Y, et al. (2009) MDM2 acts downstream of p53 as an E3 ligase to promote FOXO ubiquitination and degradation. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 13987–4000
 53. Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, Motoyama N (2002) FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 26729–26732

-
54. Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N (2000) Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *The Biochemical Journal* 349: 629–34
 55. Garsin DA, Villanueva JM, Begun J, Kim DH, Sifri CD, Calderwood SB, Ruvkun G, Ausubel FM (2003) Long-lived *C. elegans* daf-2 mutants are resistant to bacterial pathogens. *Science* 300: 1921
 56. Giannakou ME, Goss M, Jünger MA, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L (2004) Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science* 305: 361
 57. Govindaraj RG, Manavalan B, Lee G, Choi S (2010) Molecular modeling-based evaluation of hTLR10 and identification of potential ligands in Toll-like receptor signaling. *PloS One* 5: e12713
 58. Greene CM, Carroll TP, Smith SGJ, Taggart CC, Devaney J, Griffin S, O’neill SJ, McElvaney NG (2005) TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174: 1638–46
 59. Greer EL, Brunet A (2005) FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24: 7410–7425
 60. Greer EL, Brunet A (2008) FOXO transcription factors in ageing and cancer. *Acta Physiologica* 192: 19–28
 61. Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, Brunet A (2007) The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 30107–19
 62. Gruenberg J, Van Der Goot FG (2006) Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 495–504

-
63. Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M (2002) Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *The Journal of Immunology* 168: 5989–92
 64. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, Si-Tahar M (2005) Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 5571–80
 65. Guillot L, Medjane S, Le-Barillec K, Balloy V, Danel C, Chignard M, Si-Tahar M (2004) Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 2712–8
 66. Haeusler RA, Kaestner KH, Accili D (2010) FoxOs function synergistically to promote glucose production. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 35245–35248
 67. Han K-J, Su X, Xu L-G, Bin L-H, Zhang J, Shu H-B (2004) Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 15652–61
 68. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099–103
 69. Van Der Heide LP, Hoekman MFM, Smidt MP (2004) The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *The Biochemical Journal* 380: 297–309
 70. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526–9

-
71. Helmy M, Gohda J, Inoue J-I, Tomita M, Tsuchiya M, Selvarajoo K (2009) Predicting novel features of toll-like receptor 3 signaling in macrophages. *PloS One* 4: e4661
 72. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740–5
 73. Hess C, Herr C, Beisswenger C, Zakharkina T, Schmid RM, Bals R (2010) Myeloid RelA regulates pulmonary host defense networks. *European Respiratory Journal* 35: 343–352
 74. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF, Cookson WOC (2010) Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PloS One* 5: e8578
 75. Honda K, Taniguchi T (2006) IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature Reviews. Immunology* 6: 644–58
 76. Van der Horst A, Burgering BMT (2007) Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8: 440–50
 77. Van der Horst A, Tertoolen LGJ, de Vries-Smits LMM, Frye RA, Medema RH, Burgering BMT (2004) FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *The Journal of Biological Chemistry* 279: 28873–9
 78. Van der Horst A, de Vries-Smits AMM, Brenkman AB, van Triest MH, van den Broek N, Colland F, Maurice MM, Burgering BMT (2006) FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nature Cell Biology* 8: 1064–73
 79. Housley MP, Udeshi ND, Rodgers JT, Shabanowitz J, Puigserver P, Hunt DF, Hart GW (2009) A PGC-1alpha-O-GlcNAc transferase complex regulates FoxO

-
- transcription factor activity in response to glucose. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 5148–57
80. Hu MC-T, Lee D-F, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang J-Y, Zou Y, Bao S, Hanada N, Saso H, Kobayashi R, Hung M-C (2004) IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 117: 225–37
 81. Huang H, Tindall DJ (2007) Dynamic FoxO transcription factors. *Journal of Cell Science* 120: 2479–2487
 82. Huang H, Tindall DJ (2011) Regulation of FOXO protein stability via ubiquitination and proteasome degradation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813: 1961–4
 83. Hwang J, Rajendrasozhan S, Yao H, Chung S, Sundar IK, Huyck HL, Pryhuber GS, Kinnula VL, Rahman I (2011) FOXO3 deficiency leads to increased susceptibility to cigarette smoke-induced inflammation, airspace enlargement, and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of Immunology* 187: 987–998
 84. Hwangbo DS, Gershman B, Gersham B, Tu M-P, Palmer M, Tatar M (2004) *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 429: 562–6
 85. Jacobs FMJ, van der Heide LP, Wijchers PJEC, Burbach JPH, Hoekman MFM, Smidt MP (2003) FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 35959–67
 86. Jacobs KM, Pennington JD, Bisht KS, Aykin-Burns N, Kim H-S, Mishra M, Sun L, Nguyen P, Ahn B-H, Leclerc J, Deng C-X, Spitz DR, Gius D (2008) SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the Mitochondria, as well as increases FOXO3a Dependent Gene expression. *International Journal of Biological Sciences* 4: 291–299
 87. Jia HP, Kline JN, Penisten A, Apicella MA, Gioannini TL, Weiss J, McCray PB (2004) Endotoxin responsiveness of human airway epithelia is limited by low

expression of MD-2. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 287: L428–37

88. John G, Yildirim AO, Rubin BK, Gruenert DC, Henke MO (2010) TLR-4-mediated innate immunity is reduced in cystic fibrosis airway cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 42: 424–31
89. Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors *Genes & Development* 14: 142–146
90. Kagan JC, Medzhitov R (2006) Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125: 943–55
91. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R (2008) TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nature Immunology* 9: 361–8
92. Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D (2004) mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 12542–50
93. Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, Saitoh T, Kawai T, Takeuchi O, Akira S (2008) Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nature Immunology* 9: 684–91
94. Kawai T, Akira S (2007) TLR signaling. *Seminars in Immunology* 19: 24–32
95. Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* 11: 373–84
96. Kawli T, Wu C, Tan M-W (2010) Systemic and cell intrinsic roles of Gqalpha signaling in the regulation of innate immunity, oxidative stress, and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 13788–93
97. Kenyon C (2005) The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 120: 449–60

-
98. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461–4
 99. Kenyon CJ (2010) The genetics of ageing. *Nature* 464: 504–12
 100. Kim DH, Zhang T, Lee S, Dong HH (2013) FoxO6 in glucose metabolism (FoxO6). *Journal of Diabetes* 5: 233–40
 101. Kitamura YI, Kitamura T, Kruse J-P, Raum JC, Stein R, Gu W, Accili D (2005) FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metabolism* 2: 153–63
 102. Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, Horio Y, Isobe K, Ikeda K, Motoyama N (2005) SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *International Journal of Molecular Medicine* 16: 237–243
 103. Kops GJ, De Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398: 630–634
 104. Kops GJPL, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KWA, Coffey PJ, Huang T-T, Bos JL, Medema RH, Burgering BMT (2002) Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419: 316–321
 105. Kops GJPL, Medema RH, Glassford J, Essers MAG, Dijkers PF, Coffey PJ, Lam EW-F, Burgering BMT (2002) Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Molecular and Cellular Biology* 22: 2025–36
 106. Kumar H, Kawai T, Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology* 30: 16–34
 107. Kunsch C, Rosen CA (1993) NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Molecular and Cellular Biology* 13: 6137–46
 108. Latz E, Visintin A, Lien E, Fitzgerald KA, Monks BG, Kurt-Jones EA, Golenbock DT, Espevik T (2002) Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi

-
- apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 47834–43
109. Lee JC, Espéli M, Anderson CA, Linterman MA, Pocock JM, Williams NJ, Roberts R, Viatte S, Fu B, Peshu N, Hien TT, Phu NH, Wesley E, Edwards C, Ahmad T, et al. (2013) Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway. *Cell* 155: 57–69
 110. Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS (2003) Fox's in development and disease. *Trends in Genetics* 19: 339–44
 111. Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villén J, Becker EBE, DiBacco S, de la Iglesia N, Gygi S, Blackwell TK, Bonni A (2006) A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell* 125: 987–1001
 112. Li Y, Wang W-J, Cao H, Lu J, Wu C, Hu F-Y, Guo J, Zhao L, Yang F, Zhang Y-X, Li W, Zheng G-Y, Cui H, Chen X, Zhu Z, et al. (2009) Genetic association of FOXO1A and FOXO3A with longevity trait in Han Chinese populations. *Human Molecular Genetics* 18: 4897–904
 113. Li Z, Zhang H, Chen Y, Fan L, Fang J (2012) Forkhead transcription factor FOXO3a activates NF- κ B through B-cell lymphoma/leukemia (BCL10) and promotes tumor cell survival in serum-deprivation. *The Journal of Biological Chemistry*
 114. Libermann TA, Baltimore D (1990) Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Molecular and Cellular Biology* 10: 2327–34
 115. Lin K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C (1997) daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 278: 1319–22

-
116. Litvak V, Ratushny A V, Lampano AE, Schmitz F, Huang AC, Raman A, Rust AG, Bergthaler A, Aitchison JD, Aderem A (2012) A FOXO3-IRF7 gene regulatory circuit limits inflammatory sequelae of antiviral responses. *Nature* 490: 421–5
 117. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153: 1194–217
 118. Lunetta KL, D’Agostino RB, Karasik D, Benjamin EJ, Guo C-Y, Govindaraju R, Kiel DP, Kelly-Hayes M, Massaro JM, Pencina MJ, Seshadri S, Murabito JM (2007) Genetic correlates of longevity and selected age-related phenotypes: a genome-wide association study in the Framingham Study. *BMC Medical Genetics* 8 Suppl 1: S13
 119. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 194–222
 120. Matsumoto M, Seya T (2008) TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 805–12
 121. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A (2003) Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 11285–90
 122. McHugh LG, Milberg JA, Whitcomb ME, Schoene RB, Maunder RJ, Hudson LD (1994) Recovery of function in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 150: 90–4
 123. McIsaac SM, Stadnyk AW, Lin T-J (2012) Toll-like receptors in the host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection and cystic fibrosis. *Journal of Leukocyte Biology* 92: 977–85
 124. Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM (2000) AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404: 782–7

-
125. Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449: 819–26
 126. Miyata S, Begun J, Troemel ER, Ausubel FM (2008) DAF-16-dependent suppression of immunity during reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 178: 903–18
 127. Modur V, Nagarajan R, Evers BM, Milbrandt J (2002) FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 47928–47937
 128. Monsó E, Ruiz J, Rosell A, Manterola J, Fiz J, Morera J, Ausina V (1995) Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 152: 1316–20
 129. Morey P, Cano V, Martí-Llitas P, López-Gómez A, Regueiro V, Saus C, Bengoechea JA, Garmendia J (2011) Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology* 157: 234–250
 130. Morrison DK (2009) The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends in Cell Biology* 19: 16–23
 131. Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L (2004) Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 116: 551–63
 132. Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, Li H, Kenyon C (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424: 277–83
 133. Nakae J, Barr V, Accili D (2000) Differential regulation of gene expression by insulin and IGF-1 receptors correlates with phosphorylation of a single amino acid residue in the forkhead transcription factor FKHR. *The EMBO Journal* 19: 989–96

-
134. Nakae J, Park BC, Accili D (1999) Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 15982–15985
 135. Nakamura N, Ramaswamy S, Vazquez F, Signoretti S, Loda M, Sellers WR (2000) Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Molecular and Cellular Biology* 20: 8969–82
 136. Nakao Y, Funami K, Kikkawa S, Taniguchi M, Nishiguchi M, Fukumori Y, Seya T, Matsumoto M (2005) Surface-expressed TLR6 participates in the recognition of diacylated lipopeptide and peptidoglycan in human cells. *The Journal of Immunology* 174: 1566–73
 137. Nakaya T, Sato M, Hata N, Asagiri M, Suemori H, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T (2001) Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283: 1150–6
 138. Nemoto S, Finkel T (2002) Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* 295: 2450–2452
 139. Numata T, Araya J, Fujii S, Hara H, Takasaka N, Kojima J, Minagawa S, Yumino Y, Kawaishi M, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Nakayama K, Kuwano K (2011) Insulin-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK signaling pathways inhibit TLR3-mediated human bronchial epithelial cell apoptosis. *The Journal of Immunology* 187: 510–519
 140. Obsil T, Obsilova V (2011) Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813: 1946–53
 141. Obsilova V, Vecer J, Herman P, Pabianova A, Sulc M, Teisinger J, Boura E, Obsil T (2005) 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry* 44: 11608–17

-
142. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389: 994–9
 143. Over B, Ziegler S, Foermer S, Weber ANR, Bode KA, Heeg K, Bekeredjian-Ding I (2013) IRAK4 turns IL-10+ phospho-FOXO+ monocytes into pro-inflammatory cells by suppression of protein kinase B. *European Journal of Immunology* 43: 1630–42
 144. Parker D, Prince A (2011) Innate immunity in the respiratory epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45: 189–201
 145. Pawlikowska L, Hu D, Huntsman S, Sung A, Chu C, Chen J, Joyner AH, Schork NJ, Hsueh W-C, Reiner AP, Psaty BM, Atzmon G, Barzilai N, Cummings SR, Browner WS, et al. (2009) Association of common genetic variation in the insulin/IGF1 signaling pathway with human longevity. *Aging Cell* 8: 460–72
 146. Del Peso L, González VM, Hernández R, Barr FG, Núñez G (1999) Regulation of the forkhead transcription factor FKHR, but not the PAX3-FKHR fusion protein, by the serine/threonine kinase Akt. *Oncogene* 18: 7328–7333
 147. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45
 148. Pier GB (2000) Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 8822–8
 149. Plas DR, Thompson CB (2003) Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 12361–6
 150. Pollak M (2012) The insulin receptor/insulin-like growth factor receptor family as a therapeutic target in oncology. *Clinical Cancer Research* 18: 40–50
 151. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler

-
- B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085–8
152. Potente M, Urbich C, Sasaki K, Hofmann WK, Heeschen C, Aicher A, Kollipara R, DePinho RA, Zeiher AM, Dimmeler S (2005) Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *The Journal of Clinical Investigation* 115: 2382–92
153. Rackley CR, Stripp BR (2012) Building and maintaining the epithelium of the lung. *The Journal of Clinical Investigation* 122: 2724–30
154. Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG, Cohen P (1999) Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 17179–83
155. Rock JR, Hogan BLM (2011) Epithelial progenitor cells in lung development, maintenance, repair, and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27: 493–512
156. Rosenfeld M, Gibson RL, McNamara S, Emerson J, Burns JL, Castile R, Hiatt P, McCoy K, Wilson CB, Inglis A, Smith A, Martin TR, Ramsey BW (2001) Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 32: 356–66
157. Sajjan US, Jia Y, Newcomb DC, Bentley JK, Lukacs NW, LiPuma JJ, Hershenson MB (2006) *H. influenzae* potentiates airway epithelial cell responses to rhinovirus by increasing ICAM-1 and TLR3 expression. *The FASEB Journal* 20: 2121–2123
158. Salminen A, Ojala J, Huuskonen J, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K (2008) Interaction of aging-associated signaling cascades: inhibition of NF-kappaB signaling by longevity factors FoxOs and SIRT1. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 1049–58
159. Van Schilfgaarde M, Eijk P, Regelink A, van Ulsen P, Everts V, Dankert J, van Alphen L (1999) *Haemophilus influenzae* localized in epithelial cell layers is

-
- shielded from antibiotics and antibody-mediated bactericidal activity. *Microbial Pathogenesis* 26: 249–62
160. Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompmaker R, Kops GJPL, Lam EW-F, Burgering BMT, Medema RH (2002) Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Molecular and Cellular Biology* 22: 7842–52
 161. Schultze SM, Hemmings BA, Niessen M, Tschopp O (2012) PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 14: e1
 162. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M KC (1999) Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like Receptor 2. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 17406–17409
 163. Sethi S (2000) Bacterial infection and the pathogenesis of COPD. *Chest* 117: 286S–91S
 164. Sethi S (2010) Infection as a comorbidity of COPD. *The European Respiratory Journal* 35: 1209–15
 165. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP (2004) Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 31: 358–64
 166. Singh V, Aballay A (2006) Heat-shock transcription factor (HSF)-1 pathway required for *Caenorhabditis elegans* immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 13092–7
 167. Singh V, Aballay A (2009) Regulation of DAF-16-mediated Innate Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 35580–7
 168. Slevogt H, Seybold J, Tiwari KN, Hocke AC, Jonat C, Dietel S, Hippenstiel S, Singer BB, Bachmann S, Suttorp N, Opitz B (2007) *Moraxella catarrhalis* is internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and initiates

-
- a TLR2- and partly NOD1-dependent inflammatory immune response. *Cellular Microbiology* 9: 694–707
169. Su D, Coudriet GM, Hyun Kim D, Lu Y, Perdomo G, Qu S, Slusher S, Tse HM, Piganelli J, Giannoukakis N, Zhang J, Henry Dong H (2009) FoxO1 Links Insulin Resistance to Proinflammatory Cytokine IL-1 β Production in Macrophages *Diabetes* 58: 2624–2633
170. Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y (2005) JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *The Journal of Cell Biology* 170: 295–304
171. Sunters A, Madureira PA, Pomeranz KM, Aubert M, Brosens JJ, Cook SJ, Burgering BMT, Coombes RC, Lam EW-F (2006) Paclitaxel-induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH2-terminal kinase and Akt. *Cancer Research* 66: 212–20
172. Swords WE, Buscher BA, Ver Steeg II K, Preston A, Nichols WA, Weiser JN, Gibson BW, Apicella MA (2000) Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Molecular Microbiology* 37: 13–27
173. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *Journal of Immunology* 169: 10–4
174. Tang ED, Nuñez G, Barr FG, Guan KL (1990) Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 16225–16233
175. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7: 85–96

-
176. Tanimura N, Saitoh S, Matsumoto F, Akashi-Takamura S, Miyake K (2008) Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368: 94–9
 177. Teng F, Slavik V, Duffy KE, San Mateo L, Goldschmidt R (2010) Toll-like receptor 3 is involved in airway epithelial cell response to nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Cellular Immunology* 260: 98–104
 178. Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ, DiStefano PS, Chiang LW, Greenberg ME (2002) DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 296: 530–534
 179. Treggiari MM, Rosenfeld M, Retsch-Bogart G, Gibson R, Ramsey B (2007) Approach to eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 42: 751–6
 180. Troemel ER, Chu SW, Reinke V, Lee SS, Ausubel FM, Kim DH (2006) p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genetics* 2: e183
 181. Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, Yoshioka K, Masuyama N, Gotoh Y (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *The EMBO Journal* 23: 1889–99
 182. Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I (2002) NF-kappa B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation. *Journal of Leukocyte Biology* 71: 154–62
 183. Tzivion G, Avruch J (2002) 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 3061–4
 184. Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G (2011) FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813: 1938–45

-
185. Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N (2011) The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 24: 210–29
 186. Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 103: 931–43
 187. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of Biological Chemistry* 269: 5241–8
 188. Vogt PK, Jiang H, Aoki M (2005) Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle* 4: 908–13
 189. Wagner C, Isermann K, Roeder T (2009) Infection induces a survival program and local remodeling in the airway epithelium of the fly. *The FASEB Journal* 23: 2045–54
 190. Wang F, Chan C-H, Chen K, Guan X, Lin H-K, Tong Q (2012) Deacetylation of FOXO3 by SIRT1 or SIRT2 leads to Skp2-mediated FOXO3 ubiquitination and degradation. *Oncogene* 31: 1546–57
 191. Wang F, Marshall CB, Yamamoto K, Li G-Y, Gasmi-Seabrook GMC, Okada H, Mak TW, Ikura M (2012) Structures of KIX domain of CBP in complex with two FOXO3a transactivation domains reveal promiscuity and plasticity in coactivator recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6078–83
 192. Wang J, Nakad R, Schulenburg H (2012) Activation of the *Caenorhabditis elegans* FOXO family transcription factor DAF-16 by pathogenic *Bacillus thuringiensis*. *Developmental and Comparative Immunology* 37: 193–201
 193. Wang MC, Bohmann D, Jasper H (2005) JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* 121: 115–25

-
194. Ware LB, Matthay MA (2000) The acute respiratory distress syndrome. *The New England Journal of Medicine* 342: 1334–49
 195. Weigel D, Jürgens G, Küttner F, Seifert E, Jäckle H (1989) The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* 57: 645–658
 196. Willcox BJ, Donlon TA, He Q, Chen R, Grove JS, Yano K, Masaki KH, Willcox DC, Rodriguez B, Curb JD (2008) FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 13987–92
 197. Wu W, Zou M, Brickley DR, Pew T, Conzen SD (2006) Glucocorticoid receptor activation signals through forkhead transcription factor 3a in breast cancer cells. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 20: 2304–14
 198. Xuan Z, Zhang MQ (2005) From worm to human: bioinformatics approaches to identify FOXO target genes. *Mechanisms of Ageing and Development* 126: 209–15
 199. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature Immunology* 4: 1144–50
 200. Yamaza H, Komatsu T, Wakita S, Kijogi C, Park S, Hayashi H, Chiba T, Mori R, Furuyama T, Mori N, Shimokawa I (2010) FoxO1 is involved in the antineoplastic effect of calorie restriction. *Aging Cell* 9: 372–82
 201. Yang J-Y, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q, Xie X, Lang J-Y, Lai C-C, Chang C-J, Huang W-C, Huang H, Kuo H-P, Lee D-F, Li L-Y, Lien H-C, et al. (2008) ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nature Cell Biology* 10: 138–48

-
202. Yoshida K, Yamaguchi T, Natsume T, Kufe D, Miki Y (2005) JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature Cell Biology* 7: 278–85
203. Youngren JF (2007) Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 873–91
204. Zanella F, Rosado A, García B, Carnero A, Link W (2008) Chemical genetic analysis of FOXO nuclear-cytoplasmic shuttling by using image-based cell screening. *ChemBioChem* 9: 2229–37
205. Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, Granucci F, Kagan JC (2011) CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* 147: 868–80
206. Zhang M, Li Q, Zhang X-Y, Ding X, Zhu D, Zhou X (2010) Relevance of lower airway bacterial colonization, airway inflammation, and pulmonary function in the stable stage of chronic obstructive pulmonary disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 29: 1487–93
207. Zhang Z, Louboutin J-P, Weiner DJ, Goldberg JB, Wilson JM (2005) Human Airway Epithelial Cells Sense *Pseudomonas aeruginosa* Infection via Recognition of Flagellin by Toll-Like Receptor 5. *Infection and Immunity* 73: 7151–7160
208. Zhao X, Gan L, Pan H, Kan D, Majeski M, Adam SA, Unterman TG (2004) Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *The Biochemical Journal* 378: 839–49
209. Zhu Y, Chidekel A, Shaffer TH (2010) Cultured Human Airway Epithelial Cells (Calu-3): A Model of Human Respiratory Function, Structure, and Inflammatory Responses. *Critical Care Research and Practice* 2010: 8
210. Zou C-G, Tu Q, Niu J, Ji X-L, Zhang K-Q (2013) The DAF-16/FOXO transcription factor functions as a regulator of epidermal innate immunity. *PLoS Pathogens* 9: e1003660

6 Anhang

6.1 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen der folgenden Publikationen veröffentlicht.

6.1.1 Peer Review Publikationen

Seiler F, Hellberg J, Lepper PM, Kamyschnikow A, Herr C, Bischoff M, Langer F, Schäfers HJ, Lammert F, Menger MD, Bals R, Beisswenger C
(2013)

FOXO Transcription Factors Regulate Innate Immune Mechanisms in Respiratory Epithelial Cells

The Journal Of Immunology 190: 1603-13

Pfeifer P, Voss M, Wonnenberg B, Hellberg J, Seiler F, Lepper PM, Bischoff M, Langer F, Schäfers HJ, Menger MD, Bals R, Beisswenger C
(2013)

IL-17C is a mediator of respiratory epithelial innate immune response

American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 48: 415-21

Seiler F, Lepper PM, Bals R, Beisswenger C
(2014)

Regulation and function of antimicrobial peptides in immunity and diseases of the lung

Protein & Peptide Letters 21(4): 341-51

Seiler F, Beisswenger C

FOXO transcription factors and innate immunity (review)

in Bearbeitung

6.1.2 Tagungsbeiträge

Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie 2011

Homburg/Saar, 11.-12.11.2011

Plenarvortrag

Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin 2012

Köln, 25.-28.04.2012

Vortrag im Rahmen der Session „Experimentelle Infektiologie“

FASEB Science Research Conference „The Lung Epithelium in Health & Disease“ 2012

Saxtons River, VT (USA), 22.-27.07.2012

Posterpräsentation

European Respiratory Society Annual Congress 2012

Wien (Österreich), 01.-05.09.2012

Posterpräsentation im Rahmen der „Best Poster Competition“

Vortrag im Rahmen der Session „Immunologic mechanisms in COPD and asthma“

Vortrag im Rahmen der Session „New insights into airway epithelial cell physiology“

Symposium „Chronic inflammatory disorders of the lung“ 2012

Freiburg, 28.-29.09.2012

Posterpräsentation im Rahmen der Session „Asthma and allergy“

6.2 Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

- | | | |
|----|-----------------------|---|
| 1. | Robert Bals | Bereitstellung des Themas, Supervision des Projekts |
| 2. | Christoph Beisswenger | Betreuung des Projekts u. allgemeine Unterstützung |
| 3. | Jan Hellberg | Präparation von Mauslungen |
| 4. | Bodo Wonnenberg | RNA-Isolation aus Mauslungenhomogenisaten |
| 5. | Andreas Kamyschnikow | Zellkultur, Immunhistochemie |
| 6. | Anja Honecker | technische Assistenz |
| 7. | Lena Arnold | technische Assistenz |

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Saarbrücken, 22.07.2014

Unterschrift des Promovierenden

Unterschrift der die Versicherung an Eides statt aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden Beamten